

Die Regulation und Funktion von Bone Morphogenetic Protein 4 (BMP4) im malignen Melanom



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Naturwissenschaftlichen Fakultät III
-Biologie und Vorklinische Medizin-
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Simone Braig
aus Allmendingen

Dezember 2010

Promotionsgesuch eingereicht am 15. Dezember 2010

Die Arbeit wurde angeleitet von Frau Prof. Dr. Anja-Katrin Boßerhoff

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender:	Prof. Dr. Armin Kurtz
1. Gutachter:	Prof. Dr. Ernst Tamm
2. Gutachterin:	Prof. Dr. Anja-Katrin Boßerhoff
3. Prüfer:	Prof. Dr. Stephan Schneuwly

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung.....	1
2 Einleitung	3
2.1 Struktur und Aufbau der Haut.....	3
2.2 Das maligne Melanom	5
2.2.1 Inzidenz und Risikofaktoren.....	5
2.2.2 Pathogenese und Prognose	6
2.2.3 Klassifikation	7
2.2.4 Molekulare Grundlagen der Entstehung und Progression.....	8
2.3 Bone Morphogenetic Proteins (BMPs)	20
2.3.1 Struktur.....	20
2.3.2 Signaltransduktion.....	21
2.3.3 Regulation der BMP-Aktivität.....	23
2.3.4 Funktion der BMPs	25
2.3.5 Bedeutung der BMPs im malignen Melanom	27
3 Zielsetzung.....	29
4 Ergebnisse	30
4.1 Regulation der BMP4 Expression im malignen Melanom	30
4.1.1 Die Rolle von bFGF in der Regulation der BMP4 Expression	30
4.1.2 Regulation der bFGF Expression durch den Homeobox-Faktor HOX-B7.....	33
4.1.3 Einfluss der miR-196a auf die HOX-B7 Expression	35
4.1.4 Auswirkungen der anti-miR196a Behandlung auf die Melanozyten	41
4.2 Expression und Funktion von Dido1 im malignen Melanom	43
4.2.1 Identifikation neuer BMP-Zielgene.....	43
4.2.2 Expression von Dido1 im malignen Melanom	45
4.2.3 Funktionelle Relevanz von Dido1 im malignen Melanom.....	47

5	Diskussion	57
5.1	Die Mediatoren der BMP4 Expression im malignen Melanom	57
5.1.1	Der basic Fibroblast Growth Factor reguliert über Ets-1 die Expression von BMP4.....	57
5.1.2	Der Homeobox-Faktor HOX-B7 induziert die Expression von bFGF	58
5.1.3	Die HOX-B7 Expression wird durch die MicroRNA miR-196a reguliert	60
5.1.4	Funktionelle Auswirkungen des Verlustes der miR-196a Expression auf das maligne Melanom.....	62
5.2	Das BMP-Zielgen Dido1 spielt eine wichtige Rolle im malignen Melanom	64
5.2.1	Dido1 stellt ein Zielgen des BMP-Signalweges dar.....	64
5.2.2	Analyse der Expression der Dido1 Isoformen	67
5.2.3	Dido1 wird im malignen Melanom verstärkt exprimiert.....	67
5.2.4	Funktionen von Dido1 im malignen Melanom	68
6	Materialien und Methoden	73
6.1	Materialien	73
6.1.1	Allgemeine Materialien	73
6.1.2	Geräte	76
6.1.3	Bakterien	79
6.1.4	Viren.....	79
6.1.5	Zelllinien und primäre Zellen.....	79
6.1.6	Vektoren.....	80
6.1.7	Rekombinate Proteine und Antikörper	81
6.1.8	Oligonukleotide.....	82
6.1.9	Medien, Antibiotika und Puffer	84
6.2	Methoden.....	88
6.2.1	Arbeiten mit Escherichia coli.....	88
6.2.2	Molekularbiologische Arbeiten	89
6.2.3	Proteinbiochemische Arbeiten	94
6.2.4	Zellkulturmethoden	97
6.2.5	Statistik.....	102
	Eigene Publikationen	103
	Literaturverzeichnis.....	104

Abkürzungsverzeichnis	116
Danksagung	119
Erklärung	120

1 Zusammenfassung

Es ist bekannt, dass Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) an der Regulation der Progression des malignen Melanoms beteiligt sind. So konnte bereits nachgewiesen werden, dass die verstärkte Expression von BMP4 in Melanomzellen im Vergleich zu Melanozyten unter anderem die Migration und Invasion der Melanomzellen fördert.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die molekularen Mechanismen, welche in einer Induktion der BMP4 Expression im Melanom resultieren, untersucht. Es zeigte sich, dass der Verlust der Expression einer microRNA eine Signalkaskade induziert, welche über verschiedene Zwischenschritte die BMP4 Expression und die Migrationsfähigkeit der Melanomzellen fördert. Die Expression der miR-196a ist in Melanomzellen im Vergleich zu normalen Melanozyten sehr stark vermindert, was zu einer verstärkten Expression von HOX-B7 führt. Mit Hilfe von Mutationsanalysen der miR-196a Bindestelle in der 3'UTR von HOX-B7 konnte die direkte Bindung der miR-196a an HOX-B7 nachgewiesen werden. Weiterhin zeigte sich, dass das Ausschalten der HOX-B7 Expression mit Hilfe von spezifischen siRNAs in einer verminderten Expression des Wachstumsfaktors bFGF resultiert. bFGF wiederum aktiviert den Transkriptionsfaktor Ets1, welcher schließlich die BMP4 Expression induziert. Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass die Induktion der Migration im malignen Melanom über die Aktivierung der BMP4-Expression vermittelt wird.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde ein bisher unbekanntes Zielgen des BMP-Signalweges im malignen Melanom identifiziert und funktionell charakterisiert. Mit Hilfe eines Microarrays wurden in einem ersten Screening diejenigen Gene identifiziert, welche nach Behandlung mit dem Smad-spezifischen BMP-Inhibitor Dorsomorphin im Vergleich zu den kontrollbehandelten Melanomzellen vermindert exprimiert wurden. Zur Verifizierung der Microarray-Daten wurde die Expressionsstärke der potentiellen BMP-Zielgene mittels qRT-PCR analysiert. Dabei zeigte sich, dass Dido1 (Death inducer obliterator 1) die stärkste Regulation aufwies. Weiterhin konnte dargestellt werden, dass Dido1 sowohl in Melanomzellen als auch in Melanomgeweben verstärkt exprimiert wird. Funktionelle Analysen zeigen, dass Dido1 einerseits sowohl das Attachment, die Migration, die Invasion sowie das matrix-unabhängige Wachstum der Melanomzellen fördert, andererseits darüber hinaus eine anti-apoptotische Wirkung auf die Melanomzellen ausübt.

In der vorliegenden Arbeit konnten somit zum einen die regulatorischen Prozesse, welche zur Induktion der BMP4 Expression im malignen Melanom führen, aufgeklärt werden. Zum anderen konnte anhand von funktionellen Untersuchungen gezeigt werden, dass Dido1 als Smad-abhängiges BMP-Zielgen einen entscheidenden Beitrag zur Entstehung und Progression des malignen Melanoms leistet.

2 Einleitung

2.1 Struktur und Aufbau der Haut

Mit einer Fläche von 1,5–2 m² zählt die Haut zu den größten Organen des Menschen. Sie erfüllt wichtige Aufgaben als Sinnesorgan, regelt den Wärmehaushalt des Körpers und dient als mechanischer, chemischer und immunologischer Schutz. Die Haut ist aus drei Schichten aufgebaut: Epidermis, Dermis und Subkutis (Abbildung 2.1).

Die **Subkutis** stellt das Unterhautfettgewebe dar und dient der Energiespeicherung, der Wärmeisolation und wirkt als mechanisches Schutzpolster. Sie besteht vorwiegend aus Fettgewebe und wird von Blutgefäßen und Nervenfasern durchzogen. Außerdem sind hier die Talg- und Schweißdrüsen lokalisiert, welche den Schutzfilm der Epidermis produzieren.

Die **Dermis**, auch Leberhaut oder Corium genannt, besteht hauptsächlich aus Bindegewebsfasern (vor allem Kollagen Typ I und Elastin), was die hohe mechanische Festigkeit der Haut ausmacht. Zusätzlich befinden sich hier die Blut- und Lymphgefäße, Fibroblasten, Sinnesrezeptoren, Haarfollikel und Drüsenzellen. Die Papillen der Dermis sind mit der Basalschicht der Epidermis verbunden und enthalten viele Blutgefäße, welche die angrenzende Epidermis mit Nährstoffen versorgen.

Die **Basalmembran** trennt die Dermis von der Epidermis. Sie setzt sich aus der Basallamina und der Lamina reticularis zusammen. Die Basallamina besteht aus der Lamina densa und Lamina rara und enthält Proteoglykane, Kollagen Typ IV, Fibronectin und Laminin. Die Lamina reticularis ist aus einem dichten Netzwerk retikulärer Kollagenfasern aufgebaut. Die Basalmembran beeinflusst die Zelldifferenzierung und –polarität und übt eine wichtige Stützfunktion aus. Des Weiteren dient sie als schützende Barriere gegen Fremdkörper.

Die **Epidermis** oder Oberhaut besteht aus einem mehrschichtigen Plattenepithel. Die unterste Schicht, das **Stratum basale** (Basalzellschicht), enthält Basalzellen, welche sich sehr häufig teilen und innerhalb weniger Wochen an die Oberfläche gelangen. Nach Umorientierung der Zellachse und Zunahme des Zellvolumens bilden sie zunächst das **Stratum spinosum** (Stachelzellschicht). Die Zellen des **Stratum granulosum** (Körnerschicht) liegen über der Stachelzellschicht und enthalten in ihrem Zytoplasma Granula aus Keratohyalin. Dieser Eiweißstoff bildet die Vorstufe des Keratins. Daneben besteht die Körnerschicht aus stark verdichteten Tonofibrillen, welche zur Dehnbarkeit der Haut

beitragen und für die mechanische Belastbarkeit und Zugfestigkeit verantwortlich sind. Die äußere Schicht stellt das **Stratum corneum** (Hornschicht) dar. Sie besteht aus abgestorbenen Keratinozyten. Hier wird das Keratohyalin auf bislang unbekannte Weise zu Keratin umgewandelt.

Die Melanozyten, welche sich in der Basalzellschicht befinden, stammen nicht von Basalzellen ab, sondern sind neuroektodermalen Ursprungs. Die Vorläuferzellen der Melanozyten, die Melanoblasten, wandern während der Embryogenese von der Neuralleiste aus und siedeln sich in der entstehenden Haut an. Die ausdifferenzierten Melanozyten bilden aus Tyrosin das Pigment Melanin, welches mittels speziellen Vesikeln, den Melanosomen, zu den umgebenden Keratinozyten transportiert wird, um diese vor den schädlichen UV-Strahlen zu schützen. Die Melanozyten besitzen bis zu 20 dendritische Fortsätze, mit welchen sie mit den Keratinozyten in Kontakt treten. Je nach Körperregion liegen die Melanozyten in der Basalzellschicht im Verhältnis von 1:5 bis 1:10 zu den Keratinozyten vor. Die umgebenden Keratinozyten regulieren die Proliferation und das Wachstum der Melanozyten (Hsu et al. 2002).

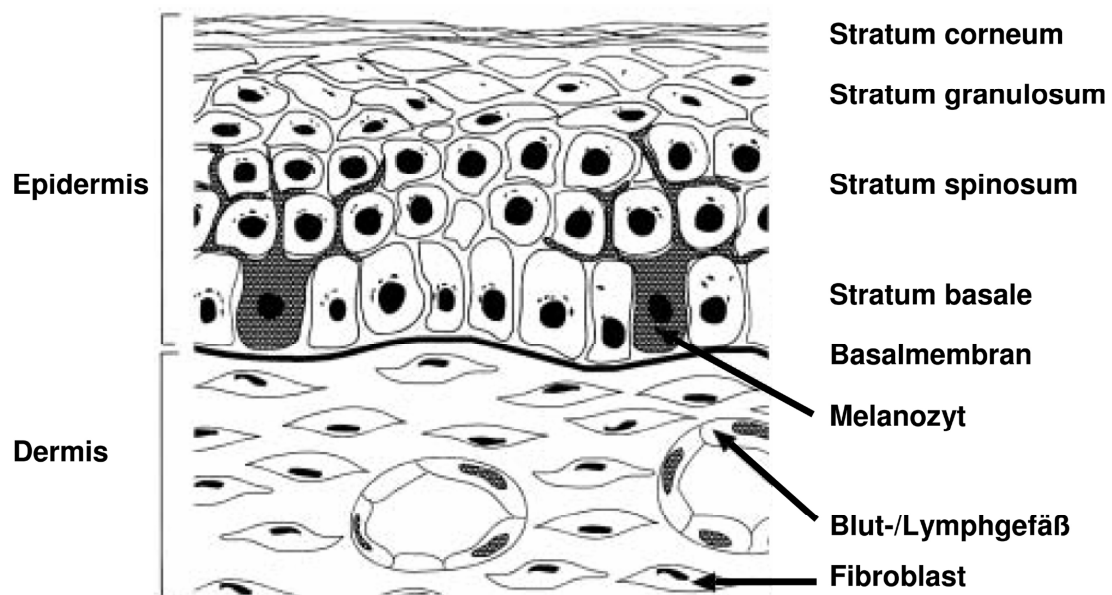


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des Aufbaus der Haut (modifiziert nach Hsu et al. 2002)

2.2 Das maligne Melanom

Das maligne Melanom (schwarzer Hautkrebs) ist ein bösartiger, stark metastasierender Tumor, welcher sich meist aus den pigmentbildenden Zellen, den Melanozyten, entwickelt. In den überwiegenden Fällen manifestiert sich der Tumor in der Haut, seltener auch im Auge (Uvea und Retina), den Schleimhäuten und den Hirnhäuten. Das maligne Melanom gehört zu den stark invasiven Tumoren und ist daher für etwa 90% der Mortalität an Hautkrebs verantwortlich.

2.2.1 Inzidenz und Risikofaktoren

Das maligne Melanom ist der Tumor mit der am schnellsten ansteigenden Inzidenz. So erkrankten in Deutschland im Jahr 1990 rund 3.650 Frauen und 2.770 Männer an einem malignen Melanom, für 2010 werden etwa 16.230 Neuerkrankungen prognostiziert. Dies entspricht etwa 18 Fällen pro 100.000 Einwohner. Das mittlere Erkrankungsalter liegt für Frauen bei vergleichsweise niedrigen 58 Jahren, für Männer bei etwa 64 Jahren. Obwohl sich seit den 80er Jahren das Risiko einer Melanomerkkrankung mehr als verdreifacht hat, sind die Mortalitätsraten etwa konstant geblieben. Dies liegt an den stetig verbesserten Vorsorgeuntersuchungen und der damit verbundenen Früherkennung und Therapie des Melanoms (Quelle: Robert-Koch Institut, Krebsregisterdaten).

Im internationalen Vergleich liegt die altersspezifische Neuerkrankungsrate von Deutschland etwa im mittleren Bereich, wobei Australien mit etwa 60 Fällen pro 100.000 Einwohner die höchste Inzidenzrate aufweist. Die Pigmentierung der Haut nimmt dabei eine bedeutende Stellung in der Melanomentwicklung ein. So sind in den skandinavischen Ländern Europas etwa 20 Fälle/100.000 Einwohnern beschrieben, während in den südlicheren Regionen weit weniger Menschen am malignen Melanom erkranken (5-10 Fälle/100.000 Einwohner).

Die Entstehung eines Melanoms wird durch mehrere Risikofaktoren begünstigt: Erhöhte Anzahl an melanozyten Nävi, exzessive Exposition gegenüber UV-Strahlung und die damit verbundene Häufigkeit von Sonnenbränden in der Kindheit, helle Haut- und Haarfarbe, hohes Alter sowie genetische Prädisposition (MacKie et al. 2009).

2.2.2 Pathogenese und Prognose

Die Entstehung und Progression des malignen Melanoms wurde erstmals von Clark anhand histopathologischer Merkmale in 5 verschiedene Phasen gegliedert (Clark et al. 1984; Clark 1991) (siehe Abbildung 2.2):

- (1) Die erste Stufe stellen normale, angeborene (kongenitale) oder erworbene **Nävi** dar. Dabei handelt es sich um gutartige (benigne) Neoplasien, welche durch die Proliferation aus normalen Melanozyten entstehen. In histologischen Untersuchungen sind dabei Nester von Melanozyten entlang der Basalmembran erkennbar. Diese Nävi müssen jedoch nicht zwangsläufig zur Entstehung eines malignen Melanoms führen. Kongenitale Nävi größer als 20 mm werden mit einer Wahrscheinlichkeit von 5% im Verlauf eines Lebens eine maligne Transformation durchlaufen. Dennoch steigt mit der Anzahl der Nävi das Risiko an einem Melanom zu erkranken deutlich an.
- (2) Es folgt das Stadium der **dysplastischen Nävi**. Diese gelten als Vorläufer des malignen Melanoms und entstehen entweder auf normaler, bisher unauffälliger Haut oder aus normalen Nävi. Dysplastische Nävi zeichnen sich durch Asymmetrie, Polymorphie und eine unkontrollierte intraepidermale Proliferation aus.
- (3) Das Melanom der **radialen Wachstumsphase** (radial growth phase, RGP) stellt das erste maligne Stadium der Melanomentstehung dar. Die Tumorzellen breiten sich horizontal in der Epidermis aus, durchdringen die Basalmembran jedoch nur lokal und sehr vereinzelt.
- (4) In der darauf folgenden **vertikalen Wachstumsphase** (vertical growth phase, VGP) zeigen die Zellen eine hohe Invasivität und erlangen bereits die Fähigkeit zur Metastasierung.
- (5) Das **metastasierende Melanom**, welches sich sowohl über die Blutbahn als auch über das Lymphgefäßsystem im Körper verbreitet, stellt die letzte Entwicklungsphase des Melanoms dar.

Bei der Entstehung und Progression des malignen Melanoms werden jedoch oftmals auch einzelne Stufen dieses Modells übersprungen. Ebenso kann durch maligne Transformation von normalen Melanozyten direkt ein Melanom entstehen (Miller und Mihm 2006).

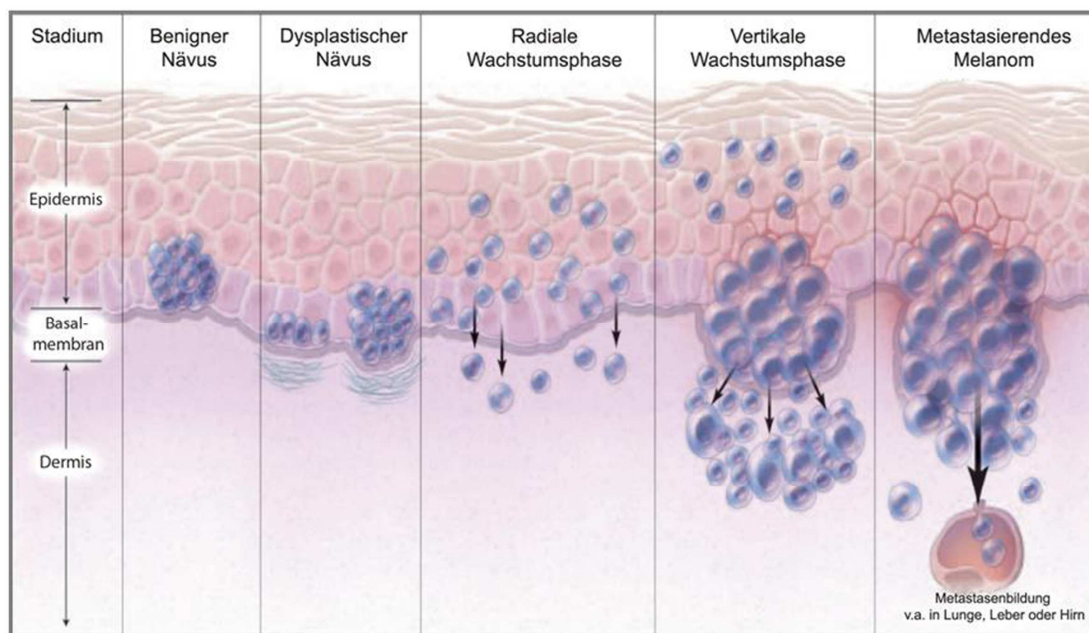


Abbildung 2.2: Die Progression des malignen Melanoms (modifiziert nach Miller und Mihm 2006)

Die Prognose des Melanoms ist abhängig von der Dicke des Primärtumors (Einteilung nach Breslow), der Eindringtiefe des Tumors (Einteilung nach Clark-Level), dem metastatischen Befall der Lymphknoten und dem Vorliegen von Fernmetastasen (Clark et al. 1969; Breslow 1970). Bei einer Eindringtiefe des Tumors von unter 1 mm liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei über 90%. Mit zunehmendem Breslow-Index nimmt die Überlebensrate jedoch auf bis zu 43% ab. Treten hingegen bereits Fernmetastasen auf, so fällt die 10-Jahres-Überlebensrate bis auf 5%. Eine kurative Behandlung durch operatives Entfernen des Melanoms ist nur in frühen Stadien des Primärtumors mit geringer Tumordicke möglich. Darüber hinaus sind die fortgeschrittenen Tumore weitestgehend resistent gegenüber konventionellen Chemo- und Radiotherapien.

2.2.3 Klassifikation

Klinisch und histopathologisch werden vier Melanomtypen unterschieden:

Das **superfiziell spreitende Melanom (SSM)** ist die am häufigsten vorkommende Form des malignen Melanoms. Es erscheint als flache, scharf abgegrenzte, braun bis schwarze Läsion der Haut und wächst meist relativ langsam in horizontaler Richtung. Dieser Subtyp des Melanoms ist vor allem an Rücken, Brust und Extremitäten lokalisiert und tritt etwa um das 50. Lebensjahr auf. Bei frühzeitiger Diagnose bestehen gute Heilungschancen.

Das **primär noduläre Melanom (NM)** stellt etwa 20% aller Melanome dar und entwickelt sich meist aus einem Muttermal (Nävuszellnävus). Die knotige Form dieses Melanoms wächst in die Breite und Tiefe, ist schwarz bis blauschwarz und neigt zu Blutungen. Es tritt meist am Rumpf und den Extremitäten auf und entsteht häufig ab dem Alter von 55 Jahren. Da dieses Melanom bereits sehr früh ein invasives Potential aufweist, ist die Prognose eher schlecht.

Das **Lentigo-maligna-Melanom (LMM)** entsteht aus einer durch chronische Lichtexposition hervorgerufenen Hautschädigung (Lentigo maligna) und tritt daher vor allem im Gesicht, am Hals und den Armen von älteren Menschen auf. Es wird in etwa 10% aller Fälle diagnostiziert und zählt deswegen eher zu den selteneren Melanomarten. LMM manifestieren sich häufig als mehrere Zentimeter große und flache Herde. Da das Melanom sehr lange horizontal wächst, sind die Heilungschancen relativ gut.

Das **akral-lentiginöse Melanom (ALM)** ist der häufigste Subtyp bei dunkelhäutigen Menschen. Es entwickelt sich in den Handflächen, unter den Nägeln, an den Fußsohlen und Schleimhäuten. Das ALM wächst über viele Jahre horizontal in der Haut, bevor es in die vertikale Wachstumsphase übergeht. Es zeichnet sich durch unscharfe, vielfarbige Flecken aus und ähnelt daher dem LMM, ist aber deutlich aggressiver. Je nach Lokalisation sind die Heilungschancen eher schlecht.

Es existieren zusätzlich auch Misch- und Sonderformen, welche etwa 5% aller Melanome ausmachen. Dazu zählen amelanotische Melanome, okkulte und okuläre Melanome sowie Schleimhautmelanome.

2.2.4 Molekulare Grundlagen der Entstehung und Progression

Die genauen Ursachen der Melanomentstehung sind nach wie vor unbekannt. Dennoch gibt es mittlerweile zahlreiche Hinweise, dass häufige Sonnenbrände in früher Jugend zu einem erhöhten Melanomrisiko führen. Besonders die UV-B Strahlen des Sonnenlichts schädigen die DNA der Melanozyten und Keratinozyten der Haut, was sich in DNA Läsionen manifestiert und dadurch zur malignen Transformation der Melanozyten beiträgt (Freeman et al. 1989). Darüber hinaus resultiert übermäßige UV-B Strahlung in einer verstärkten Expression von Wachstumsfaktoren, wie bFGF (basic fibroblast growth factor) und HGF (hepatocyte growth factor), was die Melanominiation und -progression stark begünstigt (Anna et al. 2007). Bereits in sehr frühen Stadien der Melanomentstehung zeigen die Nävuszellen atypisches Wachstum und eine veränderte Morphologie im Vergleich zu normalen Melanozyten. Da sie ihre zahlreichen Ausläuferstrukturen, mit denen sie im gesunden Gewebe mit den umgebenden Zellen interagieren, nicht mehr ausbilden,

grenzen sie sich insbesondere von den Keratinozyten ab. Während des weiteren Verlaufs verlieren die Keratinozyten vollständig die Kontrolle über die malignen Zellen, welche nun autonom werden und wichtige Fähigkeiten zur ungehemmten Proliferation, Migration und Invasion erlangen (Hsu et al. 2002). Durch aktivierende Mutationen oder Translokationen kommt es zur Überexpression von Tumor fördernden Genen (Onkogene); zusätzlich führen beispielsweise Deletionen oder Promotor-Hypermethylierungen zu einer Inaktivierung von Tumorsuppressor-Genen. Diese regulieren zahlreiche zelluläre Prozesse, wie Proliferation, Apoptose, Motilität und den Zellzyklus, wodurch sie die Progression des malignen Melanoms fördern (Polsky und Cordon-Cardo 2003). Im Folgenden werden die für die vorliegende Arbeit relevanten Moleküle und Signalwege, welche während der Melanomentstehung und -progression beteiligt sind, kurz erörtert.

2.2.4.1 Wachstumsfaktoren für die Proliferation

Normale Melanozyten benötigen für ihr Wachstum bestimmte Faktoren. Im Laufe der malignen Transformation sind die Zellen in der Lage, diese Wachstumsfaktoren mit den dazugehörigen Rezeptoren selbstständig zu exprimieren. Die Faktoren üben sowohl autokrine als auch parakrine Effekte aus und ermöglichen dadurch das autonome Wachstum der Tumorzellen. Autokrine Wachstumsfaktoren, welche die eigene Zellproliferation und Migration anregen, sind zum Beispiel bFGF (basic fibroblast growth factor), α -MSH (α -Melanotropin), IL-6, IL-8, IL-10 (Interleukin-6, -8, -10) und PDGF (platelet-derived growth factor). Parakrine Wachstumsfaktoren wie TGF- β (transforming growth factor beta), VEGF (vascular endothelial growth factor) und EGF (epidermal growth factor) stimulieren die Zellen der Tumorumgebung (Fibroblasten, Keratinozyten, Endothelzellen und Immunzellen), welche daraufhin ihrerseits Tumor fördernde Faktoren sezernieren. Diese parakrinen Effekte verändern unter anderem die Immunantwort und beeinflussen die Proliferation, die Angiogenese sowie die Aktivierung proteolytischer Enzyme. Manche Wachstumsfaktoren, wie TGF β oder IL-6, welche zunächst eine hemmende Wirkung auf die Melanozyten ausüben, können während der Tumourprogression die Proliferation der Tumorzellen fördern (Lazar-Molnar et al. 2000).

Der wahrscheinlich bedeutendste autokrine Wachstumsfaktor des malignen Melanoms ist **bFGF** (basic fibroblast growth factor, FGF2). Unter physiologischen Bedingungen wird bFGF nur von Keratinozyten und Fibroblasten sezerniert, wohingegen normale Melanozyten nicht in der Lage sind, bFGF zu exprimieren. Im Laufe der Pathogenese des malignen Melanoms produzieren die entarteten Zellen jedoch selbst bFGF. Über die Bindung an FGF-Rezeptoren vom Typ 1 bis 4 wirkt bFGF als aktivierender Wachstumsfaktor. FGF Rezeptoren gehören zur Familie der Transmembran-Rezeptoren, welche eine

Liganden-induzierbare Tyrosinkinase Aktivität aufweisen. Nach der Bindung von bFGF an den Rezeptor werden verschiedene Signalwege aktiviert, welche das Zellwachstum, die Proliferation, die Differenzierung und die Migration des malignen Melanoms stimulieren (Bikfalvi et al. 1997). Im Melanom resultiert das Ausschalten von bFGF mittels spezifischen Inhibitoren oder durch Behandlung mit neutralisierenden Antikörpern *in vitro* und *in vivo* in einer Hemmung der Proliferation und Migration sowie in einer erhöhten Apoptose-rate der Zellen (Aguzzi et al. 2010; Li et al. 2010). Werden hingegen normale Melanozyten mit bFGF cDNA transfiziert, so exprimieren diese Zellen vermehrt bFGF und zeigen ein autonomes Wachstum. Die Injektion dieser transfizierten Zellen in immundefiziente Mäuse führt dennoch nicht zur Entstehung von soliden Tumoren (Dotto et al. 1989). Diese Experimente zeigen, dass die Expression von bFGF zwar zu einem deutlichen Wachstumsvorteil führt, jedoch nicht zu einer Transformation der Melanozyten. Weiterhin übt bFGF auch parakrine Effekte auf die umgebenden Zellen aus. Wang und Becker untersuchten das Wachstum von subkutanen Melanomen in der Maus nach antisense-vermittelter Inhibition von bFGF oder nach Hemmung des FGF-Rezeptor Typ1. Die Autoren konnten beobachten, dass die Behandlung der Melanome mit antisense bFGF, bzw. antisense FGFR1 aufgrund einer verminderten Ausbildung von Blutgefäßen und der damit verbundenen unzureichenden Versorgung des Tumors zu einem kompletten Stillstand des Tumorwachstums führte (Wang und Becker 1997). Des Weiteren stimuliert bFGF die umgebenden Fibroblasten zur Produktion von Matrix-abbauenden Enzymen (MMPs), induziert die Bildung des Tumorstromas, hemmt die lokale Immunantwort und fördert die Interaktion der Tumorzellen mit der extrazellulären Matrix und dem Endothel (Shih und Herlyn 1993; Sauter und Herlyn 1998; Loffek et al. 2005).

TGFβ 1, 2 und 3 (transforming growth factor beta) wird von Melanomzellen konstitutiv exprimiert. Melanozyten hingegen produzieren nur nach Stimulation mit exogenen Wachstumsfaktoren wie IGF1 (insulin-like growth factor 1) nachweisbare Mengen an TGFβ 1 (Rodeck et al. 1994). Wie bereits erwähnt, zeigen die TGFβ Isoformen sowohl inhibierende als auch stimulierende Effekte auf die Zellen. In normalen Melanozyten hemmt TGFβ die Proliferation. Mit zunehmender Malignität des Tumors werden die Zellen jedoch resistent gegenüber diesen antiproliferativen Effekten. Durch die Induktion der Expression von Matrix-degradierenden Enzymen wirkt TGFβ daher sogar als autokriner Stimulator auf die Melanomzellen und fördert die Aggressivität und die Metastasierung des Tumors (Javelaud et al. 2005; Javelaud et al. 2008). Darüber hinaus zeigt TGFβ auch parakrine Funktionen. So fördert dieser Wachstumsfaktor die Ausbildung von Blutgefäßen (Angiogenese), aktiviert die Fibroblasten zur Produktion von Kollagen, α2 Integrin und Fibronektin, induziert die Expression von Adhäsionsmolekülen und hemmt die Immun-

antwort. Des Weiteren fördert TGF β 1 die Metastasierung des Melanoms vor allem in Knochen und Lunge (Morinaga et al. 1997; Berking et al. 2001; Javelaud et al. 2008). Da die Expression von TGF β im Lauf der Tumorentwicklung zunimmt, dient TGF β als biologischer Marker der Melanomprogression *in situ*. Zu der TGF β -Superfamilie zählen auch die BMPs (bone morphogenetic proteins), welche im Kapitel 2.3 detailliert beschrieben werden.

2.2.4.2 Proteolytische Enzyme zur Degradation der extrazellulären Matrix

Die Degradation der extrazellulären Matrix spielt bei vielen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen, wie zum Beispiel der Embryogenese und der Wundheilung, aber auch bei der Invasion der Tumorzellen bis hin zur Bildung von Fernmetastasen, eine wichtige Rolle (Eckes et al. 1999; Kurschat und Mauch 2000). Für diese Prozesse ist ein komplexes Zusammenspiel von Tumorzellen und dem umgebenden Tumorstroma notwendig. Matrix-degradierende Enzyme werden sowohl von den Tumorzellen selbst als auch von den umgebenden Zellen gebildet. Die wichtigsten proteolytischen Enzyme im malignen Melanom sind Aspartyl-, Cystein- und Serinproteinasen sowie Matrix-Metalloproteinasen (MMPs).

Zu den Aspartyl- und Cysteinproteinasen gehören die **Cathepsine B, D und H**, welche als Proenzyme synthetisiert und nach Aktivierung in Lysosomen gespeichert werden. Die Expression dieser Enzyme wird während der Progression des malignen Melanoms stark hochreguliert (Berdowska 2004). Cathepsine bauen fibrilläres Kollagen Typ I und II, Aggrecane sowie Kollagen IX und XI ab. Des Weiteren ist Cathepsin L in der Lage, intakte Basalmembranstrukturen zu degradieren (Lah und Kos 1998).

Proteasen des **Urokinase-Plasminogen-Aktivator-Systems** (uPA) und dem Gewebetyp des **Plasminogen-Aktivator-Systems** (tPA) zählen zu der Familie der Serinproteasen und werden ebenfalls als inaktive Vorstufe sezerniert. Nach der Bindung von uPA an den Rezeptor uPAR, welcher von Fibroblasten, Makrophagen und Tumorzellen exprimiert wird, wird die Protease Plasminogen aktiviert. Das dadurch entstandene Plasmin spaltet zahlreiche Matrix-assoziierte Glykoproteine, wie Fibronectin, Kollagen Typ I und Laminin. Zusätzlich aktiviert uPA die Metalloproteinasen MMP-2 und MMP-9 (Baramova et al. 1997). Die Aktivität von uPA wird durch die spezifischen Inhibitoren PAI-1 und PAI-2 (plasminogen activator inhibitor 1/2) reguliert. Im Melanom wird der Abbau der extrazellulären Matrix in schnell wachsenden Zelllinien durch uPA vermittelt, in weniger aggressiven Zelllinien wird dieser durch tPA reguliert (Hofmann et al. 2002).

Die **MMPs** (Matrix-Metalloproteinasen) sind Zink-abhängige Endopeptidasen und aufgrund ihrer Struktur, ihrer Lokalisation und Substratspezifität in fünf Untergruppen

unterteilt: Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine, membranständige Proteinasen (MT-MMPs) und sonstige MMPs. Die Expression der MMPs wird durch verschiedene Stimuli aktiviert, zum Beispiel durch Zytokine (IL-1, IL-6, TNF α), Wachstumsfaktoren (VEGF, bFGF), Hormone und Onkogene. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass Transkriptionsfaktoren der AP1 und der Ets Familie an der Regulation der MMP-Expression beteiligt sind (Westermarck und Kahari 1999; Shellman et al. 2006). Matrix-Metalloproteinasen werden als inaktive Proform synthetisiert, in latenter Form sezerniert und durch andere MMPs oder uPA aktiviert (Nagase und Woessner 1999).

Die Kollagenasen (MMP-1, -8 und -13) degradieren vor allem fibrilläres Kollagen. Die Bestandteile der Basalmembran, Gelatin und Elastin, werden hauptsächlich von den Gelatinasen MMP-2 (Gelatinase A) und MMP-9 (Gelatinase B) abgebaut. Stromelysine degradieren unter anderem Fibronectine, Laminine und Proteoglykane (Hofmann et al. 2002). Die membranständigen MMPs besitzen entweder eine Transmembrandomäne (MT1-, MT2-, MT3- und MT5-MMP) oder einen GPI-Anker (MT4- und MT6-MMP). Sie bauen verschiedene Bestandteile der extrazellulären Matrix ab, aktivieren die Proform von MMP2 und fördern die Angiogenese und die Invasivität der Tumorzellen. Die fünfte Gruppe umfasst weitere MMPs, welche sich keiner der oben genannten Gruppen zuordnen lassen, wie zum Beispiel MMP-19, -20 und -23 (Hotary et al. 2000; Morrison et al. 2001; Deryugina et al. 2002). Während der Progression des malignen Melanoms werden zahlreiche MMPs exprimiert, darunter MMP-1, -2, -3, -9, -13 sowie MT1-MMP und die entsprechenden Inhibitoren TIMP-1, -2 und -3 (tissue inhibitors of metalloproteinases) (Airola et al. 1999; Bodey et al. 2001; Corte et al. 2005). Es konnte durch unsere Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass BMPs (bone morphogenetic proteins) die Expression von Matrix-Metalloproteinasen in Melanomzelllinien und Fibroblasten induzieren: Melanomzellen, welche eine verminderte BMP-Aktivität aufweisen, zeigten eine deutlich verringerte Expression von MMP-1, -2, -3 und -9. Weiterhin konnte in BMP-behandelten Fibroblasten eine Zunahme der MMP-Expression beobachtet werden (Rothhammer et al. 2008).

2.2.4.3 Transkriptionsfaktoren des malignen Melanoms

Der Verlust oder die verstärkte Aktivität von Transkriptionsfaktoren spielt eine wichtige Rolle während der Tumorprogression. Transkriptionsfaktoren aktivieren oder reprimieren die Expression von verschiedenen Genen, welche die Proliferation, Apoptose und Differenzierung der Zellen regulieren. Werden bestimmte Transkriptionsfaktoren vermehrt oder vermindert exprimiert, so verändert sich die Expression ihrer Zielgene, was möglicherweise zu einer malignen Transformation führen kann. Im Folgenden werden einige der Melanom-relevanten Transkriptionsfaktoren näher aufgeführt.

Während der Embryogenese reguliert der Transkriptionsfaktor **AP-2 alpha** (activating enhancer binding protein 2 alpha) verschiedene Prozesse, wie Apoptose, Differenzierung und Zellwachstum (Schorle et al. 1996). Dabei bindet AP-2 alpha als Homodimer an die DNA Bindesequenz 5'-GCCNNNGGC-3' im Promotorbereich verschiedener Gene. Für das maligne Melanom konnte bislang gezeigt werden, dass die Tumorprogression mit dem Verlust der Expression von AP-2 alpha korreliert. In den frühen Phasen der Melanomentstehung hemmt AP-2 alpha als Tumorsuppressor die Aktivierung von p²¹Waf1/Cip1 und damit den Zellzyklus (Zeng et al. 1997). Des Weiteren inhibiert er die Expression des Zelladhäsionsmoleküls MCAM/MUC18 (melanoma cell adhesion molecule), weswegen der Verlust des Transkriptionsfaktors zu einer verstärkten Expression von MCAM im Verlauf der Tumorprogression führt (Jean et al. 1998). Darüber hinaus fungiert AP-2 alpha als positiver Regulator des Tyrosinkinaserzeptors c-KIT (stem cell factor receptor). Nach der Bindung des KIT Ligandes an c-KIT wird in der Zelle Apoptose induziert. Aufgrund des Fehlens von AP-2 alpha wird c-KIT im stark metastasierenden Melanom nicht mehr exprimiert und es kommt zur malignen Transformation (Huang et al. 1998). Rothhammer und Kollegen konnten zeigen, dass AP-2 die Expression von BMP4 (bone morphogenetic protein 4) negativ reguliert. Der Verlust von AP-2 führt daher zu einer erhöhten BMP4 Expression im Melanom, was die Migration und Invasion des malignen Melanoms fördert (Rothhammer et al. 2005). Ferner reguliert AP-2 alpha verschiedene weitere Gene, welche die Proliferation (HER-2), die Adhäsion (E-Cadherin), die Invasion (MMP-2) und die Angiogenese (VEGF) beeinflussen (Bar-Eli 2001).

Ets-1 gehört zur Familie der Ets Transkriptionsfaktoren, die an die Promotorsequenz 5'-GGAA/T-3' ihrer Zielgene binden. Die Aktivität der Ets Transkriptionsfaktoren wird durch Ras-MAP Kinase abhängige Phosphorylierung und Protein-Protein-Interaktionen reguliert (Sharrocks et al. 1997; Li et al. 2000). Die Ets-1 Expression und Aktivität liegt im malignen Melanom im Vergleich zu normalen Melanozyten verstärkt vor. Ets-1 aktiviert die Transkription von verschiedenen MMPs, Integrin beta3, BMP4 und uPA und fördert somit die Invasion und Metastasierung des Melanoms (Oikawa 2004; Rothhammer et al. 2004; Rothhammer et al. 2005). So konnte gezeigt werden, dass die Invasionsfähigkeit von Melanomzellen, welche mit einem antisense Konstrukt gegen Ets-1 transfiziert wurden, sehr stark vermindert war (Rothhammer et al. 2004).

Endothelzellen exprimieren ebenfalls verschiedene Ets Transkriptionsfaktoren. Sezernieren die umgebenden Melanomzellen Wachstumsfaktoren wie VEGF und bFGF, so wird die Expression von Ets-1 in den Endothelzellen induziert, was zu einer Stimulation der Expression von c-Myc, verschiedener MMPs und uPA führt. Dies wiederum fördert

die Migration und Invasion der Endothelzellen und somit die Tumorangiogenese (Oikawa 2004).

MITF (microphthalmia-associated transcription factor) bindet als Dimer an die Sequenz 5'-AGTCATGTG-3' (auch M-Box genannt). MITF zählt zur Familie der basic-helix-loop-helix Leucin Zipper Transkriptionsfaktoren. Bisher sind sechs Isoformen von MITF bekannt: MITF-A bis D, MITF-H und MITF-M. In Melanozyten und im Melanom wird spezifisch MITF-M exprimiert. MITF spielt eine sehr bedeutende Rolle in der Differenzierung und Entwicklung von Melanozyten. Des Weiteren ist MITF für das Überleben der Pigmentzellen notwendig. In vielen Melanomen liegt MITF verstärkt exprimiert vor und wirkt als Onkogen. Im Gegensatz dazu konnte auch gezeigt werden, dass die Expression von MITF im Verlauf der Malignität verloren geht und die Re-expression von MITF das Tumorwachstum und die Metastasierung inhibiert (Selzer et al. 2002; Lekmine et al. 2007). Die Regulation der MITF-Expression erfolgt durch verschiedene Transkriptionsfaktoren, wie PAX3, SOX10, CREB und LEF-1 und MITF selber (Saito et al. 2002; Yasumoto et al. 2002; Widlund und Fisher 2003). Zielgene von MITF sind Tyrosinase, TRP1, TRP2 (tyrosinase related proteins 1/2) und DCT (dopachrome tautomerase), welche an der Pigmentierung beteiligt sind. Darüber hinaus reguliert MITF durch Aktivierung der Transkription von TBX2 (T-box transcription factor 2), welcher durch Inhibition des *p19^{ARF}* Promotors die Seneszenz unterdrückt, die Proliferation der Zellen. Ferner wird durch die MITF-vermittelte Bcl-2 Hochregulation ein verbessertes Überleben der Zellen erzielt (Levy et al. 2006).

Ein weiterer wichtiger Transkriptionsfaktor im malignen Melanom ist **NFkappaB** (nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells). NFkappaB ist ein Homo- oder Heterodimer, welches sich aus Mitgliedern der Rel-Familie zusammensetzt. Es gibt fünf unterschiedliche NFkappaB Untereinheiten (p65, RelB, c-Rel, p50 und p52), von denen in Vertebraten das Heterodimer aus p50/p65 am häufigsten vertreten ist. Die Aktivität von NFkappaB wird unter anderem durch bakterielle und virale Stoffwechselprodukte, inflammatorische Zytokine (TNFalpha und Interleukine), Wachstumsfaktoren sowie oxidativen und physikalischen Stress stimuliert (Tergaonkar 2006). Das p50/p65 Heterodimer bindet an die DNA-Konsensussequenz 5'-GGGRNNYYCC-3' (R=Purin, Y=Pyrimidin) und aktiviert dadurch die Transkription von zahlreichen Zielgenen, welche für die Progression des malignen Melanoms von zentraler Bedeutung sind. Die konstitutive Aktivierung von NFkappaB im Melanom führt zu einer erhöhten Expression von anti-apoptotischen Genen, wie Bcl-2, TRAF1 und 2 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 1/2), IAP1 und 2 (inhibitor of apoptosis 1/2). Darüber hinaus stimuliert NFkappaB auch die Expression von Genen, welche den Zellzyklus regulieren, was die Proliferation der Melanomzellen fördert.

Durch Regulation der Expression von pro-angiogenetischen Genen wie VEGF, Interleukin 1 und CXCL1 und 8 (chemokine, CXC motif ligand 1/8) moduliert dieser Transkriptionsfaktor die Interaktion der Melanomzellen mit dem Tumorgefäßsystem. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass NFkappaB die Expression von N-Cadherin (neural cadherin), ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1), VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) und verschiedenen MMPs fördert und somit wesentlich zur Invasion und Metastasierung des Tumors beiträgt (Amiri und Richmond 2005; Kuphal und Bosserhoff 2006; Shen und Tergaonkar 2009).

2.2.4.4 Homeobox-Transkriptionsfaktoren

Die Homeobox-Transkriptionsfaktoren werden durch die Homeobox-Gene codiert, welche eine der wichtigsten Regulatoren der Morphogenese und der Differenzierung während der Embryonalentwicklung darstellen (Gehring und Hiromi 1986). Alle Mitglieder dieser Familie enthalten eine 183 Basenpaar lange Sequenz, die sogenannte Homeobox, welche für die hochkonservierte 60 Aminosäuren große Homeodomäne codiert. Die Homeodomäne bildet drei alpha-Helices, mit welchen sie die DNA-Sequenz 5'-TAAT-3' erkennt und bindet. Das humane Genom enthält 39 HOX Gene, die in vier verschiedenen Genclustern (HOX A bis D) von etwa 100 kb Länge angeordnet sind (Ruddle et al. 1994). Die Position der einzelnen HOX-Gene innerhalb des Chromosoms ist entscheidend für die örtliche und zeitliche Expression während der Embryogenese: HOX-Gene, welche nahe am 3'-Ende des DNA-Stranges liegen, werden früher und in anterioren Regionen exprimiert, wohingegen HOX-Gene am 5'-Ende später und posterior aktiviert werden (Krumlauf 1994). HOX-Gene werden auch in adulten Organismen exprimiert, wo sie wichtige Vorgänge wie Zellwachstum und -differenzierung sowie Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion beeinflussen (Magli et al. 1991; Srebrow et al. 1998).

In vielen Krebserkrankungen konnte eine deregulierte Expression von HOX-Genen nachgewiesen werden. Diese abnorme Expression kann laut Abate-Shen auf folgende drei Ursachen zurückgeführt werden (Abate-Shen 2002):

- 1) Die Expression der verschiedenen HOX-Gene weicht im Tumorgewebe zeitlich und räumlich von der Genexpression im normalen Gewebe ab. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass im Ösophaguskarzinom mehr Gene, welche am 5'-Ende des HOX-Clusters liegen, verstärkt exprimiert werden, wohingegen in gesunden Geweben die am 3'-Ende lokalisierten Gene die höchste Expression aufweisen (Takahashi et al. 2007).

- 2) Einzelne HOX-Gene werden in Tumoren im Vergleich zum normalen Gewebe verstärkt exprimiert. Im Fall der akuten myeloischen Leukämie (AML) wird HOXA9 hochreguliert, was mit einer ungünstigen Prognose korreliert (Golub et al. 1999).
- 3) Gene, welche im normalem Gewebe aktiv sind, können im Tumor durch epigenetische Regulation ausgeschaltet oder vermindert exprimiert werden. Bei den HOX-Genen kann diese Deregulation durch Methylierungen, Histonmodifikationen oder durch Hypermethylierung von microRNAs (siehe 2.2.4.5), welche HOX-Gene regulieren, erfolgen (Shah und Sukumar).

Generell können verschiedene Proteine, wie Shh (sonic hedgehog), FGFs, BMPs und PcG (polycomb proteins) als Regulatoren der HOX-Gene fungieren (Cillo et al. 2001). Die aberrante Expression der HOX-Gene beeinflusst verschiedene Signalwege, welche je nach Art des Tumors die Differenzierung, Apoptose, Proliferation und Metastasierung fördern können (Shah und Sukumar 2010).

In Bezug auf das maligne Melanom konnte gezeigt werden, dass die Expression von HOX-A11, HOX-A13, HOX-B9, HOX-D12 und HOX-D13 im Melanom im Vergleich zu Nävuszellen erhöht war. Darüber hinaus konnte eine verstärkte mRNA Expression von HOX-A1, HOX-A2, HOX-B13 und HOX-C4 in Melanomen, welche bereits Metastasen bildeten, nachgewiesen werden, wohingegen Melanome in den frühen Phasen der Progression nur geringe Mengen dieser HOX-Gene exprimieren (Maeda et al. 2005). Weiterhin ist bekannt, dass Melanomzellen *in vitro* und *in vivo* eine konstitutive Expression von HOX-B7 aufweisen. Durch Bindung an den *bFGF* Promotor aktiviert HOX-B7 die Expression dieses Wachstumsfaktors, was in einer verstärkten Proliferation der Melanomzellen resultiert (Care et al. 1996).

2.2.4.5 Rolle des Ras/Raf/MEK/ERK- Signalweges im malignen Melanom

Einer der bedeutendsten Signalkaskaden der Zelle ist der MAPK Signalweg (mitogen activated protein kinase) (siehe Abbildung 2.3). Er reguliert alle wichtigen Prozesse wie Differenzierung, Proliferation, Apoptose, Überleben, Zelladhäsion, Matrixdegradation und Invasion.

Durch die Bindung von Wachstumsfaktoren, Zytokinen oder Pathogenen an den Rezeptor kommt es zur Dimerisierung der Rezeptortyrosinkinase und zur Autophosphorylierung der Tyrosine des Rezeptors, wodurch das Adaptorprotein Grb2 (growth binding factor 2) binden kann (Johnson und Lapadat 2002). Grb2 ermöglicht nun die Translokation des GDP/GTP Austauschfaktors SOS (son of sevenless) an die Zellmembran. SOS wiederum aktiviert die Ras-Moleküle (H-Ras, K-Ras, N-Ras): Die zuvor inaktive Ras-GDP Form wird zur aktiven Ras-GTP Form umgewandelt, welche nun die nachfolgende Raf-Kinase (A-

Raf, B-Raf, C-Raf) aus dem Zytoplasma an die Membran rekrutiert und mit Hilfe verschiedener Kinasen (PP2A (Proteinphosphatase 2A), PAK (p21-activated kinase) und Src-Kinase) an Serin- oder Threoninresten phosphorylieren und damit aktivieren kann. Das aktivierte Raf phosphoryliert MEK1 und MEK2, welche dann ERK1/2 (p42/p44, extracellular signal-related protein kinase) durch Phosphorylierung aktivieren. ERK1/2 phosphorylieren daraufhin weitere Proteine im Zytoplasma, welche sowohl das Überleben der Zelle fördern (p90^{RSK}) als auch mit dem Zytoskelett interagieren (MAP2/4: Microtubule-associated proteins 2/4). Darüber hinaus transloziert phosphoryliertes ERK1/2 in den Zellkern und aktiviert dort verschiedene Transkriptionsfaktoren, wie c-Fos, Ets, Myc oder Elk-1 (Fecher et al. 2007).

Im malignen Melanom ist der Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg konstitutiv aktiv. Ursächlich hierfür sind teils Mutationen in den Kinasen sowie die fehlende Expression von verschiedenen Inhibitoren des Signalwegs. So besitzen über 60% aller Melanome der Haut eine Mutation im B-Raf Gen, wobei die Base Thymin durch Adenin ersetzt wurde. Dies bewirkt in der Kinasedomäne einen Aminosäureaustausch von Valin zu Glutamat (V600E). Die nun konstitutiv aktive B-Raf Kinase phosphoryliert MEK1/2 und aktiviert dadurch die Zielgene des ERK-Signalweges (Davies et al. 2002). Da B-Raf Mutationen jedoch schon in einer Vielzahl von benignen Nävi auftreten, ist diese Mutation wohl nicht alleinig für die Entartung der Zellen verantwortlich (Pollock et al. 2003). Zusätzlich wurde in einigen Melanomen, welche keine B-Raf Mutation tragen, eine aktivierende Mutation des N-Ras Gens detektiert (Alsina et al. 2003). Darüber hinaus werden im malignen Melanom verschiedene Wachstumsfaktoren, wie bFGF und HGF (hepatocyte growth factor) fortwährend produziert und sezerniert, wodurch es ebenfalls zu einer ständigen Aktivierung des ERK-Signalweges kommt. Des Weiteren werden die MAPK- Inhibitoren SPRY2 (sprouty 2) und RKIP (raf-1 kinase inhibitory protein) im Melanom nur vermindert exprimiert, wodurch der Signalweg nicht inhibiert wird und dadurch aktiv bleibt (Panka et al. 2006).

Der ERK1/2 Signalweg reguliert die Aktivität von verschiedenen Transkriptionsfaktoren, welche daraufhin die Expression zahlreicher Zielgene fördern. So führt beispielsweise die Aktivierung von Ets Transkriptionsfaktoren zu einer verstärkten Expression verschiedener Gene, welche den Zellzyklus regulieren und die Proliferation fördern (Cyclin D1, CDK1, c-Myc) (Oikawa 2004). Auch stimuliert Ets durch Induktion der Expression von MMPs und uPAs die Invasion und Metastasierung des Melanoms (Chakraborti et al. 2003).

Zusätzlich kommt es durch die Aktivierung der MAPK-Kaskade zu einer Inhibition der E-Cadherin Expression, wodurch die Zellen unabhängig von den Keratinozyten werden. Des Weiteren wird das Überleben und die Interaktion der Zellen mit der extrazellulären Matrix durch die MAPK-vermittelte Überexpression von Integrin beta3 begünstigt (Smalley 2003).

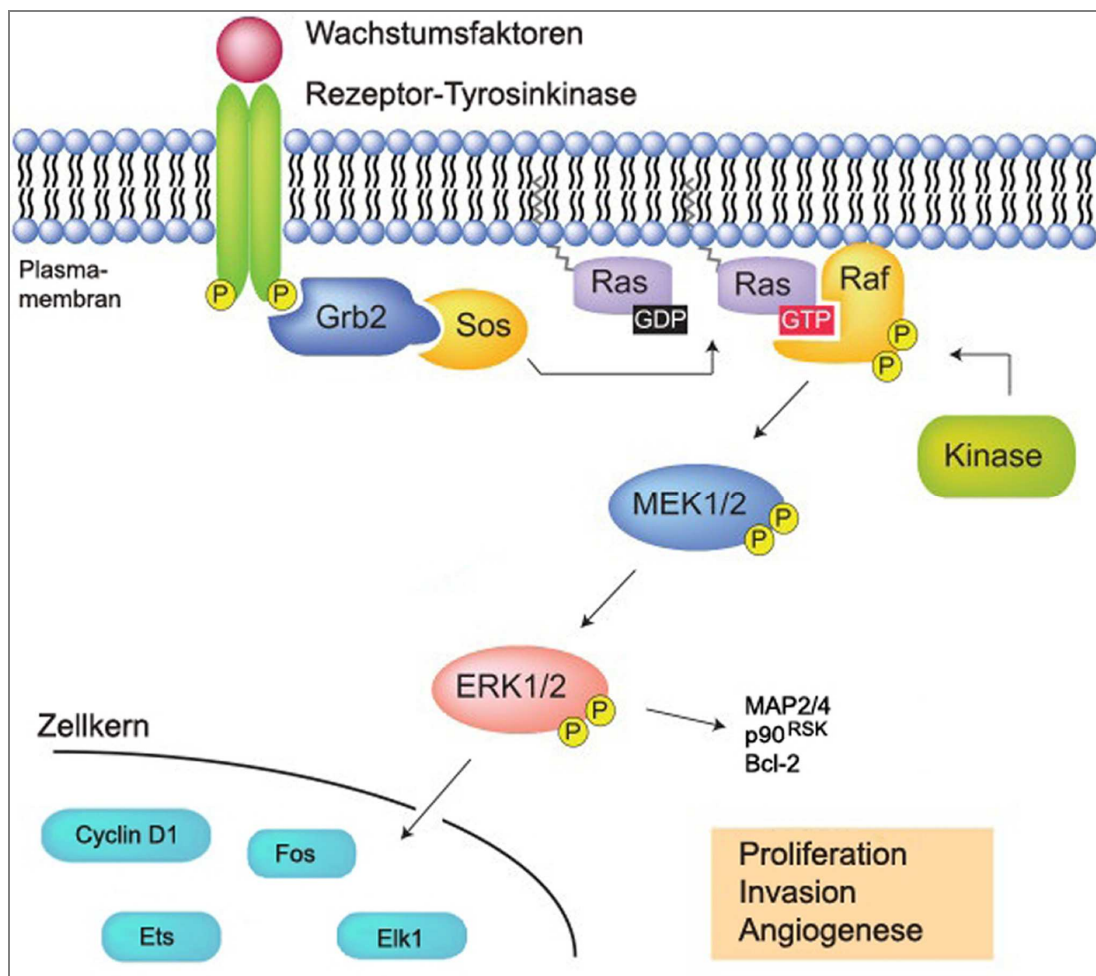


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung des Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg. Grb2: growth binding factor 2, SOS: son of sevenless (modifiziert nach Fremin und Meloche 2010.)

2.2.4.6 Regulation der Genexpression durch microRNAs

MicroRNAs (miRNAs) sind nicht-kodierende, etwa 21 Nukleotide lange RNAs, welche die Expression von zahlreichen Genen regulieren. Dabei beeinflussen sie nahezu alle wichtigen zellulären Prozesse, wie Entwicklung, Differenzierung, Proliferation, Überleben und Zelltod (Ambros 2004). Es wird vermutet, dass rund 800 verschiedene miRNAs die Aktivität von annähernd 50% aller protein-kodierenden Proteine regulieren. Jede miRNA ist in der Lage an die mRNA von bis zu Hundert Genen zu binden. Umgekehrt weisen rund 60% aller mRNAs mindestens eine miRNA-Targetsequenz auf, mit welcher wiederum mehrere miRNAs interagieren können (Garzon et al. 2010). Die Expression vieler miRNAs ist gewebe-spezifisch oder abhängig vom Entwicklungsstatus, was zu einem zelltyp-spezifischen Expressionsmuster der Zielgene beiträgt (Krol et al. 2010).

Das Gen, welches für die microRNA kodiert, wird meist von der RNA-Polymerase II transkribiert, wodurch die primary-miRNA (pri-miRNA) entsteht. Diese Vorläufer-miRNA faltet in Haarnadelstrukturen, welche als Bindestelle für die Enzyme der RNase III Familie, Drosha und Dicer dienen. Drosha spaltet mit Hilfe des dsRNA-bindenden Proteins DGCR8 die pri-miRNA in eine 70 Nukleotide lange pre-miRNA Sequenz, welche anschließend über den Ran-GTP abhängigen Nuklear-Export-Faktor Exportin5 aus dem Zellkern in das Zytoplasma transportiert wird. Dort wird die pre-miRNA durch das RNase III Enzym Dicer und dem Kofaktor TRBP (transactivation-responsive (TAR) RNA-binding protein) weiter prozessiert und es entsteht ein 18 bis 24 Nukleotide langes doppelsträngiges miRNA/miRNA* Molekül. Ein Strang dieses Duplexes (der guide-Strang) bleibt stabil und stellt im Anschluss die mature, funktionelle miRNA dar, wohingegen der andere Strang (passenger-Strang oder miRNA*) abgebaut wird. Jedoch kann der miRNA* Strang auch erhalten bleiben und als funktionelle miRNA agieren. Die mature miRNA wird dann in den miRISC (miRNA-induced silencing complex) eingebaut. Dieser Multienzymkomplex besteht neben der miRNA aus AGO (argonaute) und GW182 (glycine-tryptophan protein of 182 kDa) Proteinen, welche für die Funktion und den Aufbau des miRISC erforderlich sind. Die miRNA, welche im miRISC eingelagert ist, interagiert nun mit der 3'UTR (3'untranslated region) ihrer Zielgene und hemmt dadurch die Proteinsynthese (Krol et al. 2010). Dies kann auf zwei verschiedenen Wegen erfolgen: Entweder durch Inhibition der Translation oder durch Deadenylierung und anschließendem Abbau der mRNA. Notwendig hierfür ist allerdings eine perfekte Komplementarität der mRNA und miRNA innerhalb der Seed-Region. Die Seed-Region beschreibt die Nukleotide 2 bis 8 am 5'Ende der miRNA sowie die komplementären Nukleotide der Ziel-Sequenz am 3' Terminus (Bartel 2009). In den meisten Fällen kommt es nach Bindung des miRISC zu einer Destabilisierung der Ziel-mRNA, was zum exonukleolytischen Abbau der mRNA und damit zu einer Hemmung der mRNA Expression führt. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass manche miRNAs (zum Beispiel let7) abhängig von der Phase des Zellzyklus, in welchem sich die Zellen befinden, auch als Aktivator der Translation ihrer Zielgene fungieren können (Vasudevan et al. 2007).

MicroRNAs spielen eine wichtige Rolle in der Progression und Metastasierung zahlreicher Tumorarten (Croce 2009; Ventura und Jacks 2009). Mit Hilfe von Computeralgorithmen konnte eine Vielzahl von microRNAs detektiert werden, welche entweder die Progression des Tumors fördern oder als Tumorsuppressor fungieren. So konnte in funktionellen Studien beispielsweise gezeigt werden, dass die miR-10b die Invasion von Brustkrebszellen fördert, wohingegen die miR-31 die Metastasierung des Brustkrebs inhibiert (Ma et al. 2007; Valastyan et al. 2009). Durch verschiedene Mechanismen, wie Deletionen,

Mutationen, Promotor-Hypermethylierung, Histon-Deacetylierung oder Polymorphismen kommt es zu einer Inaktivierung der miRNA, was in einer erhöhten Expression der Zielgene resultiert. Umgekehrt führt die Überexpression oder Amplifikation einer miRNA, welche die Expression von Tumorsuppressorgen reguliert, zu einer Stimulation der Tumورprogression. Diese Mechanismen fördern die Proliferation, die Invasion und die Angiogenese des Tumors und hemmen die Apoptose der Zellen (Garzon et al. 2010).

Unsere Arbeitsgruppe konnte mit Hilfe von miRNA-Expressionsprofilen eine große Anzahl an microRNAs detektieren, deren Fehlregulation mit den verschiedenen Stadien der Melanomentstehung und -progression assoziiert ist (Mueller et al. 2009). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die verminderte Expression der microRNA let7a im malignen Melanom zu einer Induktion der Integrin beta3 Expression führt, was in einer erhöhten Invasivität der Melanomzellen resultiert (Muller und Bosserhoff 2008). Für das maligne Melanom konnte ferner dargestellt werden, dass verschiedene miRNAs (darunter miR-137, miR-182 und miR-148) die Expression von MITF hemmen und dadurch die Migration und das Überleben der Melanomzellen fördern (Haflidadottir et al. 2010; Bemis et al. 2008; Segura et al. 2009).

2.3 Bone Morphogenetic Proteins (BMPs)

Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) gehören zu der TGF β (transforming growth factor β) Superfamilie. Sie wurden erstmals in den 1960er Jahren von Dr. Marshall Urist beschrieben. Er isolierte BMPs aus demineralisierten Knochenextrakten und konnte eine knochen- und knorpelbildende Funktion dieser Proteine im Bindegewebe von Kaninchen nachweisen (Urist 1965). Bis dato wurden 14 Mitglieder der BMP Familie (BMP2-15) in verschiedenen Spezies identifiziert, welche ein breites Spektrum an biologischen Prozessen in verschiedenen Zelltypen, wie Epithelzellen, Monozyten, mesenchymalen und neuronalen Zellen regulieren (Mehler et al. 1997; Turgeman et al. 2001).

2.3.1 Struktur

Alle BMPs werden als große Vorläuferproteine synthetisiert. Diese bestehen aus einem Signalpeptid, einer Prodomäne, welche für die korrekte Faltung des Proteins nötig ist und dem C-terminal gelegenen eigentlichen Peptid. BMPs enthalten sieben konservierte Cystein-Reste, von denen sechs einen zentralen Cysteinknoten ausbilden. Der für die TGF β Familie charakteristische Cysteinknoten entsteht durch die Ausbildung von drei Disulfidbrücken zwischen je zwei Cystein-Resten. Von diesem Knoten zweigen sich vier anti-parallele β -Faltblätter ab, welche zwei Finger-ähnliche Strukturen bilden. Der siebte

Cystein-Rest ist für die Dimerisierung mit einem weiteren BMP-Monomer notwendig. Nach der Dimerisierung werden die maturen BMPs meist von der N-terminalen Proregion mit Hilfe von Serin-Endoproteasen im trans-Golgi-Netzwerk abgespalten und sekretiert. Nur bei BMP7 bleibt die Proregion erhalten. Die BMPs 2,4,5,6,7 und 8 werden zusätzlich glykosyliert. BMPs können sowohl Homo- als auch Heterodimere ausbilden. Obwohl die Heterodimere *in vitro* teilweise stärkere Effekte zeigen, ist deren *in vivo* Funktion unklar (Rider und Mulloy 2010; Xiao et al. 2007).

2.3.2 Signaltransduktion

BMPs binden an heteromere Rezeptorkomplexe, welche aus membranständigen Typ I und Typ II Serin/Threonin-Kinase Rezeptoren bestehen. Bisher wurden sieben verschiedene BMP-Rezeptoruntereinheiten identifiziert. Zu den Typ I Rezeptoren gehören BMPR-1a (Alk3), BMPR-1b (Alk6) und ActR-1a (Alk2). Hingegen zählen BMPR-2, ActR-2a/b und AMHR zu den Typ II Rezeptoren (Miyazono et al. 2005). Für die Signalübertragung durch die BMPs sind stets beide Rezeptoren notwendig. Sie enthalten eine extrazelluläre Ligand-Bindedomäne und eine intrazelluläre Serin/Threonin-Kinase Domäne. Der Typ I Rezeptor besitzt zusätzlich vor der Kinasedomäne eine Glycin/Serin reiche Region, die sogenannte GS-Box, sowie eine kurze Region mit acht Aminosäuren (L45 Loop) innerhalb der Kinase Domäne. Der BMP Rezeptor Typ II besitzt eine intrazelluläre Kinasedomäne und ist konstitutiv aktiv, wohingegen der Typ I Rezeptor erst nach erfolgter Ligandenbindung, Oligomerisierung und Transaktivierung der GS-Box durch den Typ II Rezeptor aktiviert wird. Die verschiedenen BMPs binden an die Rezeptoren mit unterschiedlicher Affinität. So zeigen BMP2 und BMP4 eine hohe Präferenz für die Rezeptoruntereinheiten BMPR-1a und BMPR-1b, wohingegen BMP6 und BMP7 vor allem an BMPR-1a und ActR-1a binden (Miyazono et al. 2010). Abhängig vom Rezeptorkomplex, an welche die BMPs binden, können sie unterschiedliche Signalwege aktivieren.

Binden die BMPs an bereits bestehende BMP-Rezeptor Typ I und Typ II-Komplexe (PFC, preformed hetero-oligomeric complex), so wird der Smad-abhängige Signalweg initiiert. Nach Bindung des Liganden an den Rezeptor-Komplex wird der Typ I Rezeptor aktiviert, welcher daraufhin über die L45 Loop Domäne spezifisch die intrazellulären, Rezeptor-regulierten R-Smads (Smad1/5/8) phosphoryliert. Die aktivierten R-Smads heterodimerisieren mit Smad4, auch Co-Smad (common Smad) genannt. Der Komplex transloziert in den Nukleus, wo er zusammen mit weiteren Kofaktoren an eine Vielzahl von Promotoren binden kann und somit die Expression der Smad-abhängigen Zielgene reguliert.

R-Smads bestehen aus zwei konservierten Regionen MH1 und MH2 (Mad homology 1/2), welche über eine Prolin-reiche Linker-Region unterschiedlicher Länge und variabler Aminosäuresequenz verbunden sind. Dabei vermittelt die N-terminal lokalisierte MH1 Domäne die Bindung an die DNA und dient als potentielle Bindestelle für weitere Proteine. Die MH2 Domäne am C-Terminus hingegen reguliert die Spezifität sowie die Erkennung des L45 Loop des BMP Typ I Rezeptors, den Transport in den Zellkern und die Oligomerisierung der Smad Proteine. Liegen die R-Smads in der unphosphorylierten Form vor, so interagieren die MH1 und MH2 Region miteinander und bilden einen autoinhibitorischen Loop aus. Nach der Phosphorylierung wird diese Struktur aufgelöst, das nukleäre Transportsignal tritt nach außen und die Affinität für Smad4 wird höher. Der entstandene Komplex aus zwei Molekülen R-Smad sowie einem Molekül Co-Smad aktiviert daraufhin im Zellkern die Transkription der BMP-Zielgene. Smad4 stabilisiert die Strukturen der Oligomere und ist somit notwendig für die hohe transkriptionelle Aktivität des Smad-Komplexes (Miyazono 1999). Zusätzlich enthält die Linker-Region der R-Smads Phosphorylierungsstellen für die MAPK und GSK3 (Glykogen Synthase 3), welche für die Stabilität der R-Smads wichtig sind (Miyazono et al.; Sieber et al. 2009) (siehe 2.3.3.4).

Neben dem klassischen Smad-abhängigen Signalweg können BMPs aber auch über die Aktivierung des p38/MAPK die Transkription von Zielgenen induzieren. Dabei binden die BMPs nur an den Typ I Rezeptor. Nach Rekrutierung des Typ II Rezeptor bildet sich ein Komplex aus Ligand, BMP-Rezeptor Typ I und II, der sogenannte BISC (BMP-induced signaling complex), welcher in „Lipid rafts“ lokalisiert ist (Sieber et al. 2009). XIAP (x-chromosome linked inhibitor of apoptosis) fungiert als Adaptorprotein, welches TAB1 (TAK binding protein 1) mit dem BMP Rezeptor Typ I verbindet. TAB1 aktiviert daraufhin TAK1 (TGF β activated kinase), was zu einer Aktivierung der p38 MAPK-Kaskade oder des JNK-Signalwegs führt (Nohe et al. 2004). Des Weiteren wurde eine BMP-abhängige Aktivierung von ERK nachgewiesen. Die Kinasen translozieren in den Zellkern, wo sie die Transkriptionsfaktoren ATF2, c-Jun oder c-Fos aktivieren, welche die Expression von MAPK-abhängigen BMP-Zielgenen, wie ALP (alkaline phosphatase), Osteopontin oder Collagen Typ I regulieren (Lai und Cheng 2002).

Die BMP-Signalkaskade ist schematisch in Abbildung 2.4 dargestellt.

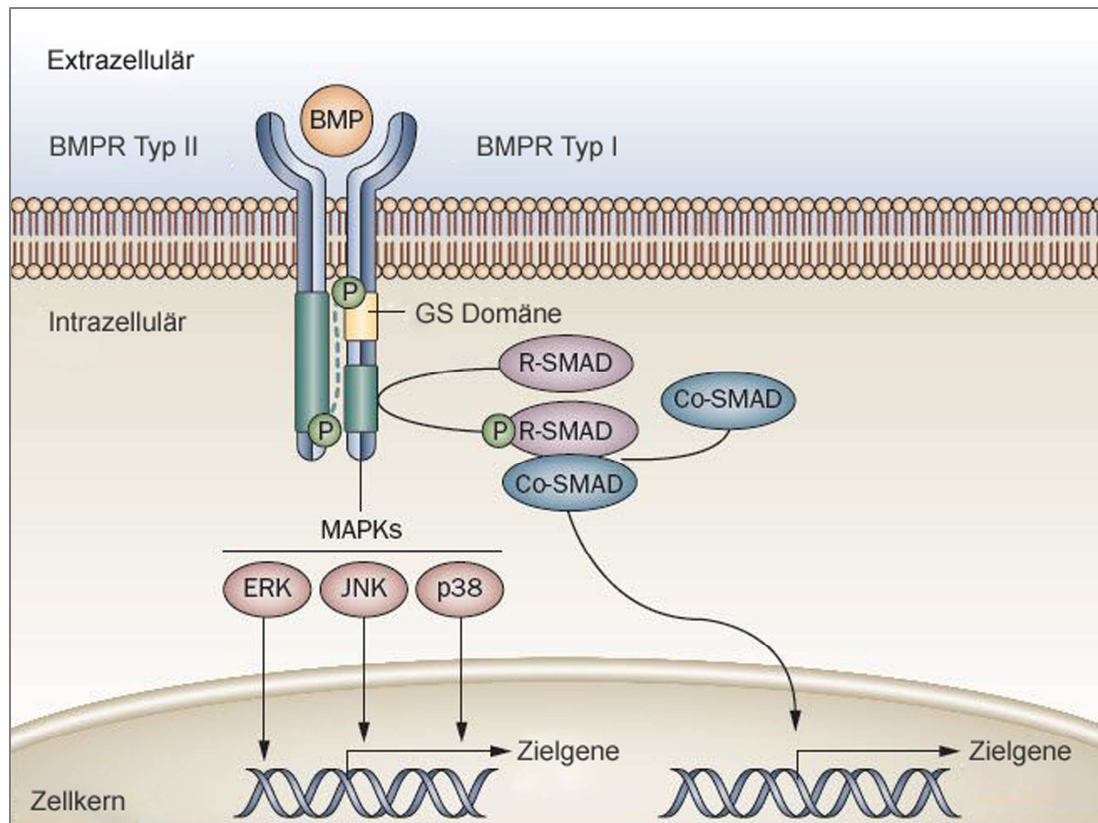


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung des BMP-Signalweges (modifiziert nach (Shore und Kaplan 2010)).

2.3.3 Regulation der BMP-Aktivität

Die Aktivität der BMPs kann durch zahlreiche unterschiedliche Mechanismen moduliert werden. Im Folgenden sollen die relevantesten Regulatoren des BMP-Signalweges kurz erläutert werden.

2.3.3.1 Extrazelluläre Antagonisten

Bei den extrazellulären Antagonisten des BMP Signalweges handelt es sich um sekretierte Peptide, welche die BMPs mit hoher Affinität binden und dadurch die Aktivierung der Signalkaskade hemmen. Diese Proteine sind meist zwischen 170 und 250 Aminosäuren lang und hemmen die verschiedenen BMPs unterschiedlich stark. Ein gemeinsames Charakteristikum aller extrazellulären Inhibitoren stellt die Ausbildung eines Cysteinknotens (auch von-Willebrand Typ C Domäne genannt) dar, welcher die Faltung des Peptides bestimmt und die Protein-Protein-Interaktionen erleichtert. Ein wichtiger Inhibitor ist **Noggin**, der spezifisch, aber mit unterschiedlicher Affinität an BMP2, 4, 5, 6 und 7 bindet. Die Expression von Noggin wird über einen negativen „Feedback-Loop“ durch die BMPs 2 und 4 selbst reguliert. Zu den extrazellulären Antagonisten zählen

weiterhin die Mitglieder der **Chordin** Familie. Chordin bindet ebenfalls an BMP2, 4 und 7 und hat keine Affinität für weitere Mitglieder der TGF β -Superfamilie. Chordin wiederum wird durch die Interaktion mit anderen sekretierten Proteinen der extrazellulären Matrix reguliert. So spaltet die Metalloprotease Tolloid die Chordin-BMP-Komplexe, wodurch BMPs wieder frei werden und an die Rezeptoren binden können. Andere Mitglieder dieser Familie, wie Crossveinless-2 (CV2), fördern hingegen die Aktivität der BMPs. **Twisted gastrulation** (Tsg) ist ebenfalls ein sekretiertes Glykoprotein, welches sowohl BMP2 und 4 als auch Chordin-BMP-Komplexe bindet und somit die hemmende Wirkung von Chordin potenzieren kann. Zusätzlich wirkt Tsg auch als BMP Agonist, indem es die Spaltung der Chordin-BMP-Komplexe fördert. Man vermutet, dass das Verhältnis der Konzentrationen zwischen Tsg, Chordin und Tolloid bestimmt, ob Tsg hemmend oder aktivierend auf den BMP-Signalweg wirkt. Die Mitglieder der **Dan** Familie umfassen zahlreiche Proteine, wie Gremlin, Sclerostin, Dan, Cerberus und Caronte, welche ebenfalls durch Bindung an die Liganden die BMP-Signalkaskade inhibieren (Walsh et al. 2010; GAZZERRO und CANALIS 2006).

2.3.3.2 BMP-Pseudorezeptoren und inhibitorische Smads

Der Pseudorezeptor **BAMBI** (BMP and activin bound protein) ist ein Transmembran-Glycoprotein mit einer extrazellulären Domäne, welche den TGF β und BMP Rezeptoren Typ I ähnelt. Er enthält jedoch keine intrazelluläre Serin/Threonin Kinase Domäne. BAMBI bindet an die BMP Rezeptoren und verhindert dadurch die Ausbildung eines funktionellen BMP-Rezeptor-Komplexes. Die Expression von BAMBI wird durch BMPs, TGF β und Wnt aktiviert (GAZZERRO und CANALIS 2006).

Inhibitorische Smad Proteine **Smad 6 und 7** (I-Smads) hemmen den BMP-Signalweg intrazellulär auf verschiedene Arten. Sie konkurrieren einerseits mit den R-Smads um die Bindung an den Rezeptor Typ I, andererseits interagieren sie mit Smad4 und inhibieren dadurch die R-Smad/Co-Smad Komplexbildung. Smad 7 hemmt sowohl den BMP- als auch den TGF β -Signalweg, während Smad6 hauptsächlich die BMP-Signalweiterleitung inhibiert. Die Expression der I-Smads wird unter anderem durch TGF β reguliert (Park 2005).

2.3.3.3 Smad-bindende Proteine

Die Ko-Repressoren **Ski** (homolog of v-ski avian sarcoma viral oncogene) und **Sno** (Ski-related novel gene/Ski-like) interagieren mit den Smad Molekülen, wobei Ski Smad 2,3 und 4 hemmt und Sno an Smad 2 und 4 bindet. Ski und Sno sind vor allem als Inhibitoren des TGF β -abhängigen Signalweges bekannt, durch Bindung an Smad4 sind sie jedoch

auch in der Lage, die BMP Signalkaskade zu hemmen (Park 2005). Zu der Ski-Familie zählen auch **Fussel 15** (functional smad suppressing element on chromosome 15) und **Fussel 18** (functional smad suppressing element on chromosome 18). Dabei inhibiert Fussel 15 den BMP-Signalweg, während Fussel 18 die TGF β Signalkaskade negativ beeinflusst (Arndt et al. 2007).

2.3.3.4 Ubiquitinierung und proteasomaler Abbau

Nach Aktivierung der R-Smads phosphorylieren MAPK und GSK3 die Linker-Region der R-Smads, was zur Ubiquitylierung durch die Ubiquitinligasen **Smurf1 und 2** führt. Anschließend werden die R-Smads proteasomal abgebaut. Zusätzlich interagieren Smurf Proteine mit den I-Smads, indem sie einerseits den Export der I-Smads vom Zellkern ins Zytoplasma fördern und andererseits die Bindung der I-Smads an die aktivierten BMP Typ I Rezeptoren begünstigen. Des Weiteren induzieren Smurfs die ubiquitin-abhängige Degradation der Rezeptoren, was in einer verminderten Rezeptordichte auf der Zelloberfläche resultiert (Miyazono et al. 2005).

2.3.3.5 Ko-Rezeptoren

Mehrere Ko-rezeptoren aus unterschiedlichen Proteinfamilien fördern die BMP-abhängige Signalweiterleitung. So wurden **RGMa, b und c** (repulsive guidance molecules a-c) beschrieben, welche mit Hilfe eines GPI-Ankers in der Membran lokalisiert sind und als Ko-rezeptoren für BMP2 und 4 fungieren (Babitt et al. 2005; Samad et al. 2005). Weitere Korezeptoren sind **Endoglin** und **Betaglykan**, welche neben BMP2 und 4 auch TGF β 1 und 3 binden (Barbara et al. 1999; Kirkbride et al. 2008).

2.3.4 Funktion der BMPs

BMPs beeinflussen zahlreiche zelluläre Prozesse, wie Proliferation, Chemotaxis, Zelltod, Adhäsion, Differenzierung und Motilität (Hogan 1996). Daneben steuern BMPs fundamentale Prozesse während der **Embryonalentwicklung**. Durch die Expression der BMP-Inhibitoren Chordin und Noggin im Spemann-Organisator (dorsale Urmundlippe) entsteht im frühen Embryo ein BMP-Aktivitätsgradient, welcher die dorso-ventrale Körperachse determiniert. Wie in Untersuchungen an *Xenopus laevis* gezeigt werden konnte, fördert eine hohe BMP-Aktivität die Ausbildung des ventralen Ektoderms (Epidermis) und des Mesoderms (zum Beispiel Niere und Blut), wohingegen eine niedrige Aktivität die Entwicklung des dorsalen Ektoderm (Neuroektoderm) und Mesoderms (zum Beispiel Muskelgewebe) induziert (Smith und Harland 1992; Yamamoto und Oelgeschlager 2004).

Darüber hinaus induzieren BMPs die Kondensation von mesenchymalen Zellen und deren Differenzierung zu Chondrozyten und Osteoblasten.

BMPs fördern ebenfalls die enchondrale **Osteogenese** und damit die Entwicklung des embryonalen Knorpelgerüsts, des Skeletts und der Extremitäten (Wozney 1992; Yi et al. 2000). Rekombinante BMPs werden seit 2001 auch zur Therapie von schlecht heilenden Knochenbrüchen verwendet. Studien zeigen, dass bestimmte Frakturen durch die Behandlung mit BMP2 oder BMP7 deutlich schneller heilen (Dean et al. 2009).

Ferner sind BMPs auch an der **Entstehung und Progression verschiedener Krebsarten** beteiligt. So konnte zum Beispiel in diversen *in vitro* Studien gezeigt werden, dass vor allem die BMPs 2, 4, 6 und 7 eine positive Auswirkung auf die Entstehung oder die Metastasierung zahlreicher Tumorarten, wie Nierenzellkarzinom, Osteosarkom, Medulloblastom, Ovarialkarzinom, Prostatakrebs und Mamakarzinom aufweisen (Thawani et al.). So führt beispielsweise die verstärkte Expression von BMP4 im Verlauf des Kolonkarzinoms zu einer gesteigerten Migrationsfähigkeit und Invasivität der Zellen. Des Weiteren werden die Kolonkarzinomzellen resistent gegenüber Apoptose, fördern die Expression des Urokinase Typ des Plasminogenaktivators (uPA) und ändern dadurch ihre Morphologie in Richtung eines invasiven Phänotyps (Deng et al. 2007). Ebenso ist BMP2 in der Lage, die Migrations- und Invasionsfähigkeit zu stimulieren, wie anhand von Studien an nicht kleinzelligen Lungenkarzinomzellen gezeigt werden konnte. *In vivo* induziert BMP2 das Wachstum der Lungentumore, nach Behandlung mit dem BMP-Inhibitor Noggin wurde die Progression dagegen deutlich reduziert (Langenfeld et al. 2003). Zusätzlich zeigte sich eine pro-angiogenetische Wirkung von BMP2 auf Lungenkarzinomzellen (Langenfeld und Langenfeld 2004).

In mehreren Untersuchungen konnte demonstriert werden, dass genetische Alterationen der BMP-Signalkaskade die Entstehung von verschiedenen Tumorarten begünstigen. Beispielsweise belegten genetische Studien, dass die familiäre juvenile Polyposis (FJP) auf Mutationen von Smad4 und des BMP Rezeptors Typ Ia (Alk3) zurückzuführen ist. Juvenile Polypen treten meist im Kolon und Magen auf und können sich zu einem Karzinom entwickeln (Hardwick et al. 2008).

Allerdings können BMPs auch als Tumorsuppressoren wirken. So führt beispielsweise das Ausschalten von BMP7 in Prostatakarzinomzellen zu einer erhöhten Migration und Invasion der Zellen. Ferner vermindert die Behandlung mit BMP7 sowie die konstitutive Expression des BMP Rezeptor Typ Ia (Alk3) die Proliferationsfähigkeit der Prostatakrebszellen (Miyazaki et al. 2004; Ye et al. 2007). Darüber hinaus zeigte Piccirillo in Glioblastomzellen, dass BMP4 das Wachstum des transplantierten Tumors und die damit

verbundene Mortalität deutlich hemmt (Piccirillo und Vescovi 2006). Diese Studien veranschaulichen, dass BMPs abhängig von der Tumorart sowohl onkogenes als auch tumorsuppressives Potential aufweisen können. Dies ist wahrscheinlich auf die komplexen Interaktionen der BMP-Signalkaskade mit weiteren wichtigen Signaltransduktionswegen der Zelle, wie Notch, Wnt, FGF und Hedgehog-Signalwegen zurückzuführen (Thawani et al. 2010; Bailey et al. 2007; Katoh 2007).

2.3.5 Bedeutung der BMPs im malignen Melanom

Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits zeigen, dass BMPs eine wichtige Rolle während der Entstehung und Progression des malignen Melanoms spielen. So zeigte sich eine Hochregulation der Expression zahlreicher BMPs in den untersuchten Melanomzelllinien im Vergleich zu normalen Melanozyten. In weiteren Analysen konnte eine sehr starke *BMP4* Promotoraktivität im Melanom nachgewiesen werden. Anschließende Sequenzanalysen der Promotorregion ergaben Hinweise auf potentielle Bindestellen bekannter Transkriptionsfaktoren. Die näheren Untersuchungen ergaben, dass die BMP4 Expression durch Bindung des Transkriptionsfaktors AP2 alpha gehemmt wird, wohingegen Ets1 die Aktivität des Promotors fördert. In funktionellen Analysen konnte Frau Dr. Rothhammer darstellen, dass die artifizielle Reduktion der BMP4 Aktivität durch antisense Technik oder durch Überexpression des BMP-Inhibitors Chordin in einer verminderten Migrations- und Invasionsfähigkeit der Melanomzellen resultiert, wohingegen die Proliferation und das Matix-unabhängige Wachstum der Zellen nicht beeinflusst wurde (Rothhammer et al. 2005). Des Weiteren induzieren BMPs die Fähigkeit der Tumorzellen zur Ausbildung von tubenförmigen Strukturen („vasculogenic mimicry“), was die Angiogenese und damit die Versorgung des Tumors mit Nährstoffen fördert. Neben diesen autokrinen Effekten wirken BMPs auch als parakrine Stimulatoren auf die Zellen in der Tumorumgebung. So induziert die Behandlung von HMECs (humane mikrovaskuläre Endothelzellen) mit rekombinatem BMP2 und BMP4 die Tubenbildung der Zellen. Weiterhin wiesen die Melanomzellen mit verminderter BMP Aktivität eine starke Reduktion der Expression verschiedener Gene, welche die Tumor-Angiogenese und die Ausbildung von Tuben fördern, auf. In Migrationsassays konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass BMPs auch als Chemoattraktans auf die Endothelzellen wirken. Diese Ergebnisse konnten auch *in vivo* bestätigt werden. Dazu wurden Melanomzellklone mit verminderter BMP Aktivität subkutan in Nacktmäuse injiziert. Tumore, welche aus diesen Klonen entstanden waren, wiesen eine deutlich verringerte Anzahl an Gefäßstrukturen auf (Rothhammer et al. 2007).

Des Weiteren zeigen Melanomzellklone mit verminderter BMP Aktivität eine starke Reduktion der Expression von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs). Zusätzlich führt die Behandlung von Fibroblasten mit BMP2 und BMP4 zu einer erhöhten Expression verschiedener MMPs, welche durch Degradation der Basalmembran die Invasion der Melanomzellen fördern (Rothhammer et al. 2008).

Nähere Untersuchungen zeigten außerdem, dass BMP7 als potentieller prognostischer Marker für rezidivfreies Überleben bei Melanompatienten eingesetzt werden kann (Rothhammer et al. 2007).

3 Zielsetzung

Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Progression des malignen Melanoms. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Expression von verschiedenen BMPs in Melanomzellen im Vergleich zu Melanozyten hochreguliert ist. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass insbesondere BMP4 die Migration und Invasion des Melanoms fördert. Darüber hinaus ist BMP4 an der Regulation der Neoangiogenese beteiligt.

(1) Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollten die Regulationsmechanismen, welche zu einer verstärkten Expression von BMP4 im malignen Melanom führen, untersucht werden. Obwohl die Funktionen von BMP4 im Melanom weitestgehend bekannt sind, ist die molekulare Ursache der Hochregulation der BMP4 Expression noch größtenteils unklar. Daher sollte nun die Signalkaskade analysiert werden, welche in einer Induktion der BMP4 Expression resultiert und somit die Progression des malignen Melanoms fördert.

(2) Da bislang lediglich Id-1 als direktes Zielgen der BMPs beschrieben werden konnte, sollten im zweiten Teil der Arbeit neue Zielgene des Smad-abhängigen BMP-Signalweges definiert werden. Zur Identifikation potentieller BMP-Zielgene wurde ein Microarray durchgeführt. Diese Gene sollten anschließend in funktionellen Analysen genauer charakterisiert werden.

4 Ergebnisse

Die im Abschnitt 4.1 zusammengefassten Daten zur Regulation der BMP4 Expression im malignen Melanom konnten bereits publiziert werden (siehe Anhang „Eigene Publikationen“).

4.1 Regulation der BMP4 Expression im malignen Melanom

Es ist bekannt, dass Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Progression verschiedener Tumorarten spielen (siehe 2.3.4). So konnte von unserer Arbeitsgruppe bereits gezeigt werden, dass besonders die verstärkte BMP4 Expression von zentraler Bedeutung in der Entstehung und Progression des malignen Melanoms ist (Rothhammer et al. 2005). BMP4 beeinflusst die Migration und Invasion von Melanomzellen, indem stimulatorische Effekte sowohl auf die Melanomzellen selbst als auch auf die umgebenden Fibroblasten ausgeübt werden (Rothhammer et al. 2005). Die Regulation der BMP4 Expression im malignen Melanom ist hingegen noch weitestgehend unbekannt. So konnte bislang lediglich gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor AP-2 als negativer Regulator der BMP4 Expression dient, wohingegen Ets-1 die Expression von BMP4 positiv beeinflusst (Rothhammer et al. 2005).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun der molekulare Mechanismus, welcher zur Induktion der BMP4 Expression im malignen Melanom führt, analysiert werden. Die nachstehenden Untersuchungen erfolgten in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Tanja Rothhammer (Molekulare Pathologie, Universitätsklinikum Regensburg) und Herrn Dr. Daniel Müller (Molekulare Pathologie, Universitätsklinikum Regensburg). Dabei bearbeitete Frau Dr. Rothhammer die Regulation der BMP4 Expression durch bFGF und Herr Dr. Müller führte die Computeranalysen zur Identifikation der miR-196a durch, befasste sich mit den Klonierungen der HOX-B7 3'UTR sowie den anti-miR-196a Behandlungen.

4.1.1 Die Rolle von bFGF in der Regulation der BMP4 Expression

In der Vergangenheit konnte bereits für verschiedene Normal- und Tumorgewebe ein Zusammenhang zwischen Mitgliedern der fibroblast growth factor Superfamilie (FGF Familie) und der Familie der bone morphogenetic proteins (BMPs) dargestellt werden (Kato 2007; Montesano et al. 2008). So wurde gezeigt, dass während der Knochenentwicklung die Aktivität der BMP2 induzierten Signalkaskade durch die Behandlung mit

rekombinanten bFGF (basic Fibroblast growth factor) ansteigt (Nakamura et al. 2005). Um nun eine potentielle Regulation der verstärkten BMP4 Expression durch bFGF im malignen Melanom zu untersuchen, wurde die Melanomzelllinie Mel Im mit einem BMP4 Reporterkonstrukt zusammen mit einem bFGF Expressionsplasmid, bzw. der Leervektor-Kontrolle transfiziert. Es zeigte sich, dass die *BMP4* Promotoraktivität bei Ko-Transfektion mit dem bFGF Expressionskonstrukt im Vergleich zur Transfektion mit dem Leervektor um mehr als das Vierfache anstieg (Abbildung 4.1). Analog zu den vorherigen Studien, bei denen gezeigt werden konnte, dass der Transkriptionsfaktor Ets-1 die Expression von BMP4 erhöht (Rothhammer et al. 2005), führte die Ko-Transfektion eines Ets-1 Reporterkonstruktes zusammen mit dem bFGF Expressionskonstrukt zu einer etwa 300% erhöhten Ets-1 Aktivität im Vergleich zur Kontrolltransfektion (Abbildung 4.1).

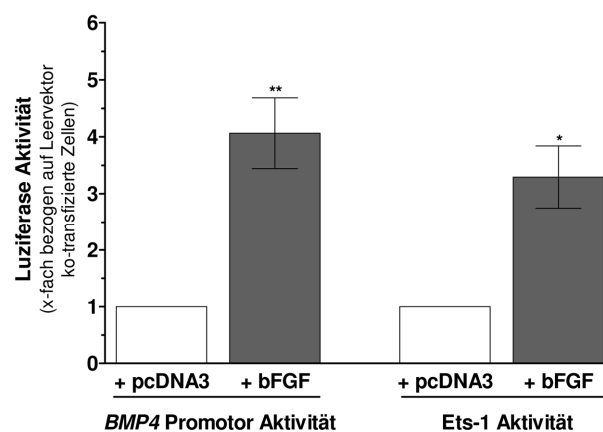


Abbildung 4.1: Luziferase Aktivität nach Ko-Transfektion eines BMP4 bzw. Ets-1 Reporterkonstrukts mit einem bFGF Expressionsplasmid bzw. dem Leervektor pcDNA3 in Mel Im Zellen. Im Vergleich zu den Kontrollzellen, welche neben dem jeweiligen Reporterkonstrukt zusammen mit dem pcDNA3 Leervektor transfiziert wurden, war die Luziferase Aktivität in den mit dem BMP4 Expressionsplasmid transfizierten Zellen über 4fach, in den mit dem Ets-1 Konstrukt behandelten Zellen über das Dreifache erhöht.

Des Weiteren wurden normale humane epidermale Melanozyten (NHEMs) und Mel Im Zellen mit einem Adenovirus, welches bFGF bzw. EGFP exprimiert, für 48 Stunden transduziert. Wie mittels qRT-PCR dargestellt, wiesen die mit dem bFGF exprimierenden Adenovirus behandelten Zellen im Vergleich zu den Zellen, welche mit dem EGFP exprimierenden Adenovirus behandelt wurden, eine deutlich erhöhte BMP4 mRNA Expression auf. In Analogie dazu resultiert die Transfektion von Mel Im Zellen mit einer gegen bFGF gerichteten siRNA in einer stark verminderten mRNA Expression von BMP4 im Vergleich zur Transfektion mit Kontroll-siRNA (Abbildung 4.2).

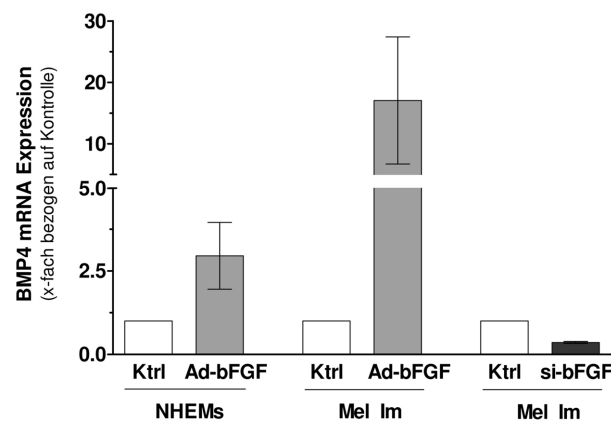


Abbildung 4.2: qRT-PCR Analyse der BMP4 mRNA Expression in NHEMs und Mel Im Zellen. Die BMP4 mRNA Expression ist nach Transduktion mit einem bFGF exprimierenden Adenovirus in beiden Zelltypen im Vergleich zur Kontrolle stark erhöht. Die Transfektion der Mel Im Zellen mit einer siRNA gegen bFGF führt hingegen zu einer Reduktion der BMP4 Expression um über 60% im Vergleich zur Transfektion mit einer Kontroll-siRNA.

Aus der Literatur ist weiterhin bekannt, dass bFGF ein wichtiger Modulator der Migration von Melanomzellen ist (Meier et al. 2000). Um aufgrund der bisherigen Ergebnisse zu untersuchen, ob der positive Effekt von bFGF auf das migratorische Potential der Melanomzellen auf die Induktion der BMP4 Expression zurückzuführen ist, wurden Mel Im Zellen für 24 Stunden mit einem inhibitorischen bFGF Antikörper behandelt und in Boyden Kammer Assays eingesetzt. Dabei zeigte sich, dass das migratorische Potential der Melanomzellen um etwa 40% im Vergleich zu unbehandelten Zellen reduziert war. Wurden die Mel Im Zellen hingegen für 24 Stunden mit rekombinatem BMP4 inkubiert, so erhöhte sich deren Migrationsverhalten. Weiterhin konnte dargestellt werden, dass die Behandlung mit rekombinantem BMP4 zusammen mit dem inhibitorischem bFGF Antikörper dessen hemmende Effekte vollständig kompensierte (Abbildung 4.3). Wie in 5.1.4 diskutiert, weist dies darauf hin, dass das Migrationsverhalten der Melanomzellen vielmehr durch BMP4 denn bFGF vermittelt wird.

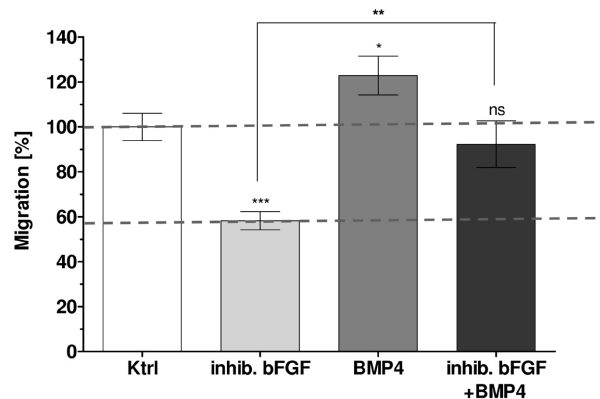


Abbildung 4.3: Analyse der Migrationsfähigkeit von Mel Im Zellen nach Inkubation mit inhibitorischem bFGF Antikörper, rekombinanten BMP4 und der Kombination beider Moleküle. Die Inkubation von Mel Im Zellen mit einem inhibitorischen bFGF Antikörper führte zu einer Reduktion des migratorischen Potentials, wohingegen BMP4 die Migration der Melanomzellen förderte. Die gleichzeitige Behandlung mit beiden Molekülen hob den Effekt des inhibitorischen bFGF Antikörpers auf.

4.1.2 Regulation der bFGF Expression durch den Homeobox-Faktor HOX-B7

Untersuchungen von Carè und Kollegen weisen darauf hin, dass die mRNA Expression von bFGF im malignen Melanom durch den Homeobox-Transkriptionsfaktor HOX-B7 reguliert wird (Care et al. 1996). In Folge dessen wurde mittels qRT-PCR die mRNA Expression von HOX-B7 in je vier Melanomzelllinien aus Primärtumoren und Melanommetastasen im Vergleich zu NHEMs analysiert. Die HOX-B7 mRNA Expression lag in den Melanomzellen im Vergleich zu den NHEMs über 50fach verstärkt vor (Abbildung 4.4 A). Zusätzlich konnte die Hochregulation der HOX-B7 Expression erstmals auch auf Proteinebene mittels Immunfluoreszenz Färbungen an je zwei primären und metastatischen Melanomzelllinien (Mel Wei und Mel Juso, bzw. Mel Ju und Mel Im) nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den normalen Melanozyten zeigten die Melanomzellen nach Inkubation mit einem gegen HOX-B7 gerichteten Antikörper eine starke Färbung (Abbildung 4.4 B und Abbildung 4.8 C). Eine zusätzliche Färbung mit DAPI markiert die DNA im Zellkern.

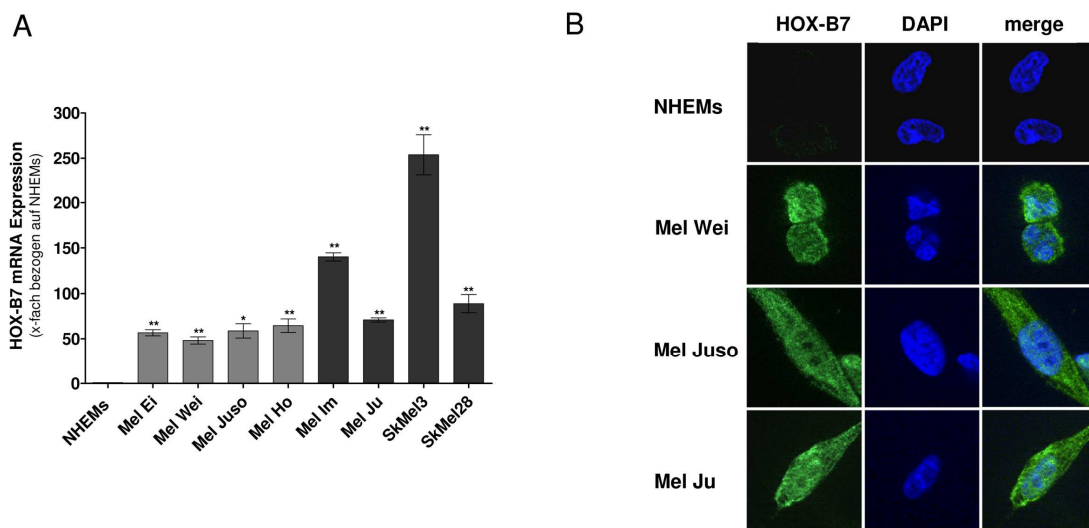


Abbildung 4.4: Expression von HOX-B7 in Melanomzelllinien und NHEMs. Die Melanomzelllinien wiesen im Vergleich zu den NHEMs eine stark erhöhte Expression von HOX-B7 auf mRNA Ebene (A) und auf Protein Ebene (Immunfluoreszenz, B) auf. Die grauen Balken stellen die Melanomzelllinien aus Primärtumoren dar, die schwarzen Balken zeigen Zelllinien aus Melanommetastasen.

Um eine potentielle Regulation von bFGF und BMP4 durch HOX-B7 zu untersuchen, wurden Mel Im Zellen mit zwei unterschiedlichen siRNAs gegen HOX-B7 und einer Kontroll-siRNA für 48 Stunden transfiziert (siehe 6.2.4.2). Da beide siRNAs die mRNA Expression von HOX-B7 sehr stark reduzierten (Abbildung 4.5 A), wurden die folgenden Versuche mit einer 1:1 Mischung aus beiden siRNAs gegen HOX-B7 durchgeführt. Auch die Untersuchung der HOX-B7 Proteinexpression mittels Immunfluoreszenz Färbungen zeigte nach Transfektion mit der HOX-B7 siRNA im Vergleich zur Transfektion mit der Kontroll-siRNA eine deutlich verminderte Expressionsstärke (Abbildung 4.5 B). Darüber hinaus konnte mittels qRT-PCR bzw. ELISA Analysen dargestellt werden, dass die Transfektion mit den siRNAs gegen HOX-B7 in einer starken Abnahme der mRNA- und Proteinexpression der potentiellen Zielgene bFGF und BMP4 resultiert (Abbildung 4.5 C, D).

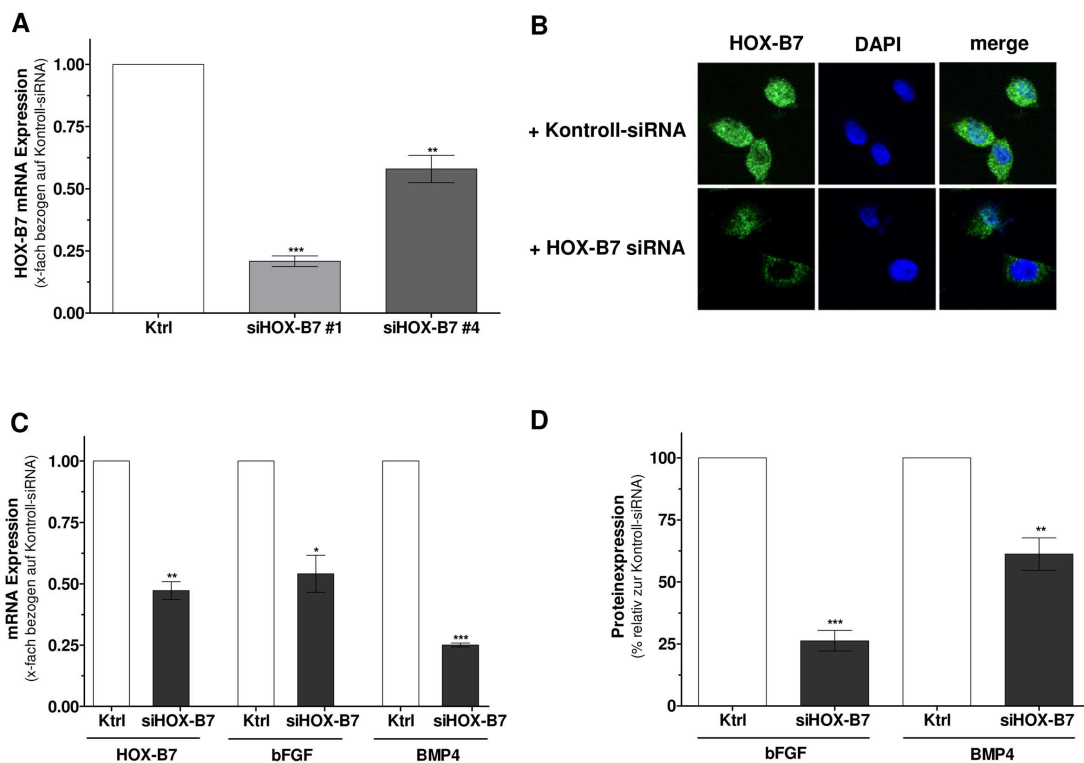


Abbildung 4.5: Einfluss des Knockdowns von HOX-B7 auf die Expression von HOX-B7, bFGF und BMP4. (A) Die HOX-B7 Expression konnte durch Transfektion zweier unterschiedlicher siRNAs gegen HOX-B7 (siHOX-B7#1 und siHOX-B7#4) um 40-75% im Vergleich zur Kontrolle reduziert werden. (B) Die Immunfluoreszenz Färbungen zeigen ferner eine deutlich verminderte HOX-B7 Protein Expression nach Transfektion mit einer 1:1 Mischung der beiden HOX-B7 siRNAs. (C,D) Die Expression der nachgeschalteten Gene bFGF und BMP4 wurde durch Transfektion mit siHOX-B7 auf (C) mRNA- und (D) Proteinebene im Vergleich zu kontroll-transfizierten Zellen um bis zu 75% reduziert.

4.1.3 Einfluss der miR-196a auf die HOX-B7 Expression

Verschiedene Studien zeigten, dass microRNAs (miRNAs) die Expression von *hox* Genen negativ beeinflussen können (Chopra und Mishra 2006; Garzon et al. 2008). Mansfield und Kollegen beschrieben die Lokalisation der microRNA miR-196a in den HOX Clustern (HOX A bis D) der HOX Transkriptionsfaktoren (Mansfield et al. 2004). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die miR-196a an die 3'UTR von HOX-B8 bindet und dadurch die Degradation der mRNA Sequenz auslöst (Yekta et al. 2004).

Die von Dr. Müller durchgeführten Computeranalysen mit Hilfe der Programme miRanda (Griffiths-Jones 2006), TargetScan S (Lewis et al. 2003) und PicTarVert (Krek et al. 2005) wiesen auf eine Bindestelle der miR-196a im Bereich der 3'UTR des HOX-B7 Gens hin. Da miRNAs einen inhibitorischen Einfluss auf ihre Zielgene ausüben, ist für eine mögliche Regulation der HOX-B7 Expression durch die miR-196a ein gegenläufiges Expressionsmuster der beiden Moleküle notwendig. Daher müsste die miR-196a Expression bei der

vorliegenden verstärkten Expression von HOX-B7 (Abbildung 4.4) stark vermindert sein. Dies konnte durch qRT-PCR Analysen bestätigt werden. Es zeigte sich, dass die Melanomzelllinien im Vergleich zu den Melanozyten einen fast vollständigen Verlust der miR-196a Expression aufwiesen (Abbildung 4.6).

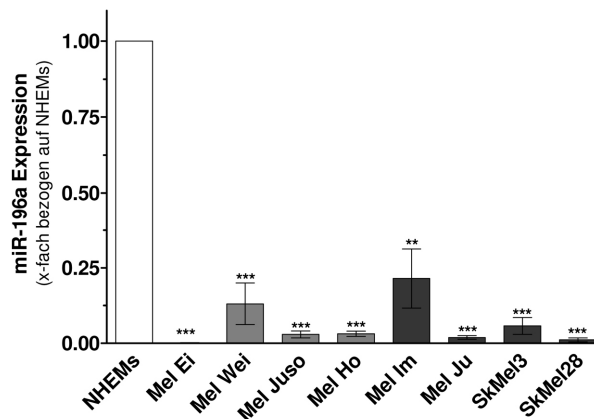


Abbildung 4.6: Analyse der miR-196a Expression in NHEMs und Melanomzelllinien mittels qRT-PCR. Die Melanomzelllinien zeigten eine deutlich reduzierte Expression von miR-196a im Vergleich zu den Melanozyten.

Um einen möglichen regulatorischen Einfluss der miR-196a auf die HOX-B7 Expression und die nachgeschalteten Gene zu untersuchen, wurden stabile miR-196a Klone generiert. Dazu wurden Mel Im Melanomzellen mit miR-196a-1 und miR-196a-2 Expressionskonstrukten, bzw. der Leerkontrolle pcDNA3 stabil transfiziert. Obwohl die primäre Sequenz der miR-196a im humanen Genom auf zwei Chromosomen kodiert ist (Chromosom 17 und 12), unterscheidet sich die mature Nukleotidsequenz nicht. Um dennoch potentielle Unterschiede der miR-196a-1 und miR-196a-2 vermittelten Regulation auf HOX-B7 sicher ausschließen zu können, wurden beide Expressionskonstrukte generiert und stabil transfiziert. Es zeigte sich jedoch im weiteren Versuchverlauf, dass die Re-expression von miR-196a-1 oder miR-196a-2 keine unterschiedlichen Auswirkungen auf die Melanomzellen hatte. Die erhöhte Expression der miR-196a in Mel Im stabil transfizierten Zellklonen konnte durch qRT-PCR Analysen bestätigt werden. Im Gegensatz zu den mit dem Leervektor pcDNA3 transfizierten Zellklonen zeigten die miR-196a Klone eine 4 bis 10fach erhöhte miR-196a Expression (Abbildung 4.7).

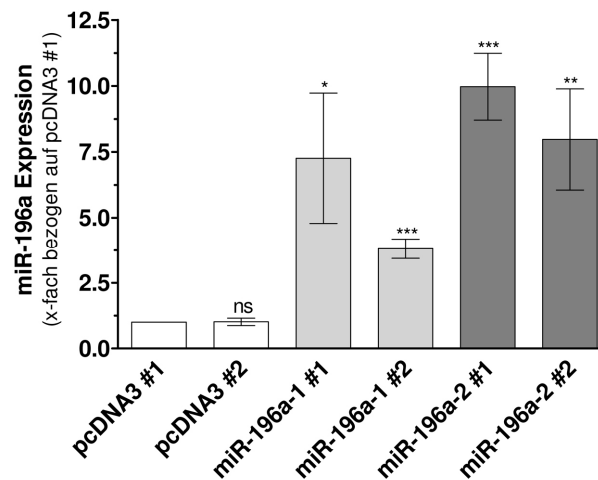


Abbildung 4.7: miR-196a Expression in miR-196a stabil transfizierten Mel Im Zellklonen. Mel Im Zellen, welche stabil mit miR-196a Expressionskonstrukten transfiziert wurden, zeigen im Vergleich zu den pcDNA3 Kontrollklonen eine deutliche Überexpression der miR-196a.

Anschließend wurde zur Überprüfung der Funktionalität der überexprimierten miR-196a Moleküle in den stabilen Zellklonen die Expression des bereits verifizierten miR-196a Zielgenes HOX-B8 untersucht (Yekta et al. 2004). Durch qRT-PCR Analysen war es möglich, eine etwa 50%ige Herunterregulation der HOX-B8 Expression in den stabilen miR-196a Zellklonen im Vergleich zu den pcDNA3 Klonen nachzuweisen (Abbildung 4.8 A). Die Untersuchung der HOX-B7 Expression in den miR-196a re-exprimierenden Zellklonen zeigte eine deutliche Abnahme der HOX-B7 mRNA Expression um ca. 50% bis 75% im Vergleich zu den Kontrollklonen (Abbildung 4.8 B). Diese Ergebnisse ließen sich durch Immunfluoreszenz-Färbungen bestätigen. In den stabilen miR-196a Zellklonen konnte im Vergleich zu den pcDNA3 Zellklonen und den parentalen Mel Im Melanomzellen nur eine sehr geringe HOX-B7 Proteinexpression detektiert werden (Abbildung 4.8 C).

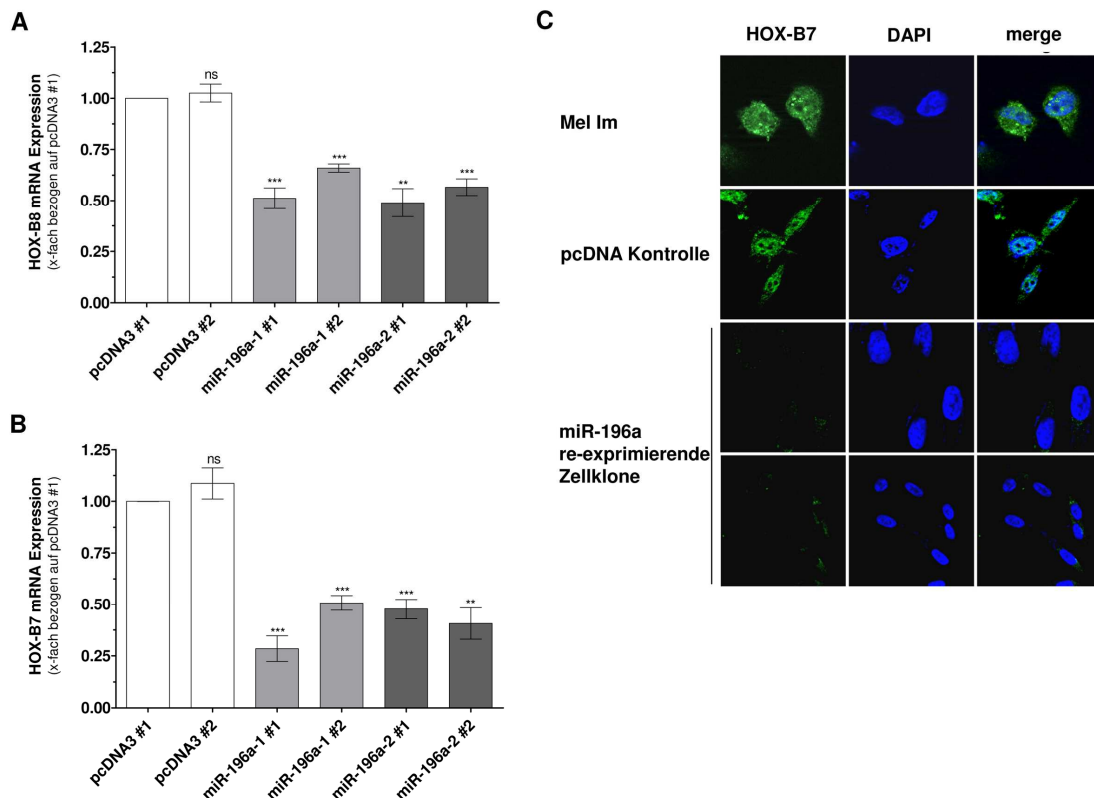


Abbildung 4.8: HOX-B8 und HOX-B7 Expression in miR-196a re-exprimierenden Zellklonen. Die miR-196a Zellklone zeigten eine sehr starke Reduktion der HOX-B8 (A) und HOX-B7 (B) mRNA Expression im Vergleich zu den pcDNA3 Kontrollklonen. (C) Durch Immunfluoreszenz Färbungen konnte die verminderte HOX-B7 Expression in den miR-196a re-exprimierenden Zellklonen auch auf Proteinebene nachgewiesen werden.

Das inverse Expressionsprofil der miR-196a und HOX-B7 in den normalen Melanozyten, den Melanomzelllinien und den miR-196a re-exprimierenden Zellklonen weist auf eine Regulation der HOX-B7 Expression durch die microRNA miR-196a hin. Um eine Bindung der miR-196a an die 3'UTR von HOX-B7 nachzuweisen, wurde von Dr. Müller ein Reporterkonstrukt generiert, welches hinter dem Luziferase Gen des pGL3 control Vektors ein 570bp langes Fragment der vorhergesagten miR-196a Targetsequenz (Abbildung 4.9 A) in der HOX-B7 3'UTR beinhaltet (siehe 6.1.6). Erkennt die miR-196a nun die vorhergesagte Target-Sequenz und bindet an das 3'UTR Fragment, so sollten Zellen, welche miR-196a exprimieren, durch die inhibitorische Wirkung der microRNA eine verminderte Luziferase Aktivität zeigen. NHEMs, welche eine hohe endogene miR-196a Expression aufweisen, wurden mit dem HOX-B7 3'UTR Reporterkonstrukt (HOX-B7_3'UTR_wt (wildtyp)) bzw. einer Leervektor Kontrolle (pGL3 control) transfiziert. Es zeigte sich dabei, dass die Luziferase Aktivität in den HOX-B7_3'UTR_wt transfizierten NHEMs im Vergleich zu den pGL3 control transfizierten Zellen um etwa 70% verringert

war (Abbildung 4.9 C). Zusätzlich wurde die vorhergesagte 3'UTR der HOX-B7 Sequenz mutiert (HOX-B7_3'UTR_mut (mutiert)) (siehe 6.1.6) (Abbildung 4.9 B). Nach Deletion von 10bp der Target-Sequenz ist keine Bindung der miR-196a an die 3'UTR und damit keine Interaktion möglich. Durch Transfektion von NHEMs mit dem mutierten HOX-B7 3'UTR Konstrukt erreichte die Luziferase Aktivität eine vergleichbare Stärke wie in den Zellen, welche mit dem leeren pGL3 control Vektor transfiziert wurden (Abbildung 4.9 C). Ferner wurden Mel Im Zellen mit dem miR-196a Expressionsplasmid bzw. der pcDNA3 Kontrolle zusammen mit den HOX-B7 3'UTR Reporterkonstrukten ko-transfiziert. Dabei nahm die Luziferase-Aktivität in den Zellen, welche mit dem HOX-B7 wildtyp Reporterkonstrukt und den miR-196a Expressionskonstrukten ko-transfiziert wurden, um über 50% im Vergleich zu der Transfektion mit dem pcDNA Konstrukt ab (Abbildung 4.9 D). Hingegen zeigte die Ko-transfektion des Konstruktes mit der mutierten Targetsequenz des 3'UTR Bereichs von HOX-B7 mit den miR-196a Plasmiden keine signifikante Änderung der Luziferase Aktivität im Vergleich zur pcDNA Kontrolle (Abbildung 4.9 D). Diese Ergebnisse belegten eindeutig die direkte Bindung der miR-196a an den 3'UTR Bereich des HOX-B7 Gens und die damit verbundene Inhibition der HOX-B7 Genexpression.

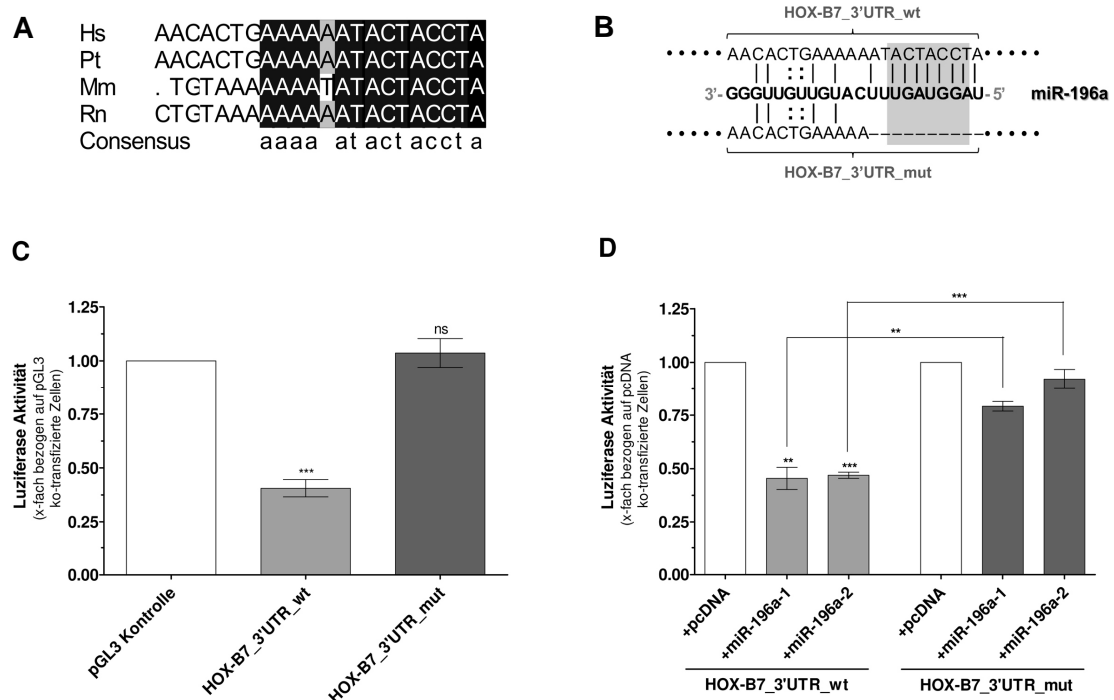


Abbildung 4.9: Nachweis der direkten Interaktion der miR-196a mit der HOX-B7 3'UTR.

(A) Schematische Darstellung der konservierten miR-196a Targetsequenz in der HOX-B7 3'UTR (Hs: *Homo sapiens*, Pt: *Pan troglodytes*, Mm: *Mus musculus*, Rn: *Rattus norvegicus*) (B) oben: Reporterkonstrukt, welches die Sequenz der vorhergesagten Interaktion der miR-196a mit der wildtyp HOX-B7 3'UTR Sequenz (HOX-B7_3'UTR_wt) beinhaltet, unten: Reporterkonstrukt, bei welchem 10bp der 3'UTR Target-Sequenz deletiert wurden (HOX-B7_3'UTR_mut) und dadurch eine Interaktion mit der miR-196a verhindert. Das graue Quadrat zeigt die Nukleotide der miR-196a Seed-Sequenz. (Fortsetzung siehe nächste Seite)

Abbildung 4.9: Nachweis der direkten Interaktion der miR-196a mit der HOX-B7 3'UTR. (Fortsetzung) (C) Die Luziferase Aktivität nahm in den NHEMs nach Transfektion mit dem HOX-B7_3'UTR_wt Konstrukt im Vergleich zu den kontroll-transfizierten NHEMs sehr stark ab, wohingegen dieser Effekt durch Transfektion mit dem HOX-B7_3'UTR_mut Plasmid aufgehoben wurde. (D) Die Ko-transfektion von Mel Im Zellen mit dem HOX-B7_3'UTR_wt Reporterkonstrukt zusammen mit den miR-196a Expressionskonstrukten führte zu einer starken Verminderung der Luziferase Aktivität verglichen mit kontroll-transfizierten pcDNA3 Zellen. Hingegen zeigte die Luziferase Expression nach Ko-transfektion von HOX-B7_3'UTR_mut zusammen mit den miR-196a Expressionskonstrukten keine Veränderungen im Vergleich zu den mit pcDNA3 ko-transfizierten Mel Im Zellen.

Um die Effekte der miRNA Regulation auf die nachgeschalteten Gene von HOX-B7 zu untersuchen, wurden ELISA Analysen zur Bestimmung der bFGF und BMP4 Proteinexpression in den miR-196a re-exprimierenden Zellen durchgeführt. Wie Abbildung 4.10 A zeigt, war die bFGF Proteinexpression in den miR-196a Zellklonen im Vergleich zu den pcDNA3 Zellklonen um etwa 70% vermindert. Ferner exprimierten die stabil transfizierten miR-196a Mel Im Zellen über 40% weniger BMP4 als die Kontrollzellen (Abbildung 4.10 B). Des Weiteren konnte dargestellt werden, dass die mRNA Expression von Id1, einem bekannten BMP4-Zielgen, in den miR-196a Zellklonen drastisch reduziert war (Abbildung 4.10 C). Schließlich wurde durch Boyden Kammer Assays die funktionelle Relevanz der Re-expression der miR-196a in den Melanomzellen analysiert. Das migratorische Potential der Melanomzellen, welche stabil mit der miR-196a transfiziert wurden, war im Vergleich zu Kontrollzellen um etwa 50% reduziert (Abbildung 4.10 D).

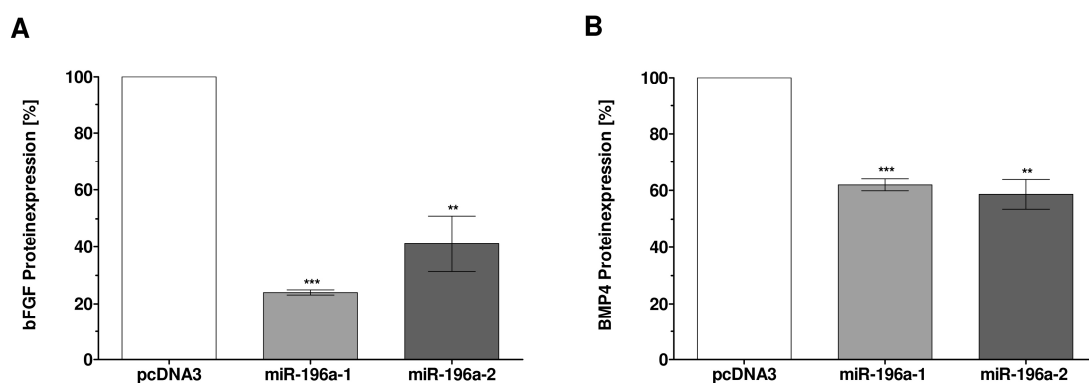


Abbildung 4.10: Einfluss der Überexpression der miR-196a auf die Expression der HOX-B7 Zielgene und das migratorische Potential der Zellen. ELISA Analysen ergaben eine deutliche geringere bFGF (A) und BMP4 (B) Proteinexpression in den miR-196a stabil transfizierten Zellklonen im Vergleich zu kontroll-transfizierten Klonen. (Fortsetzung siehe nächste Seite)

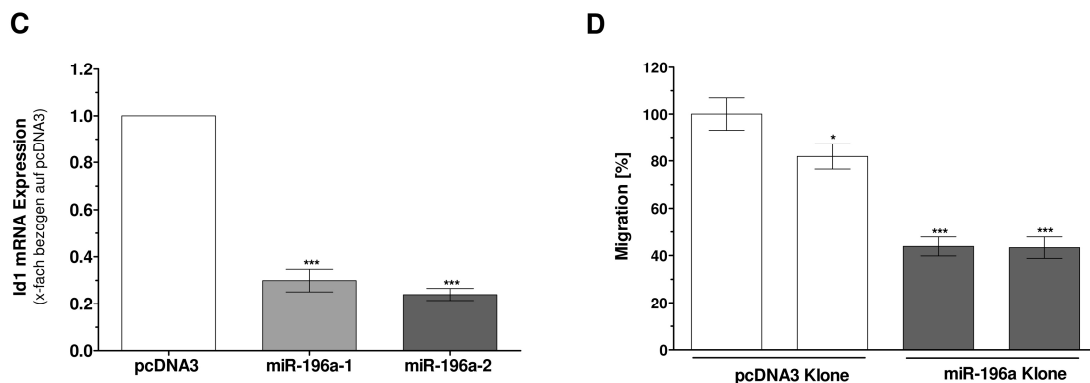


Abbildung 4.10: Einfluss der Überexpression der miR-196a auf die Expression der HOX-B7 Zielgene und das migratorische Potential der Zellen. (Fortsetzung) (C) Das BMP-Zielgen Id1 wies in den miR-196a Klonen ebenfalls eine stark verminderte mRNA Expression verglichen mit den Kontrollzellen auf. (D) Die miR-196a Klone zeigten im Vergleich zu den pcDNA3 Klonen eine verminderte Migrationsfähigkeit.

4.1.4 Auswirkungen der anti-miR196a Behandlung auf die Melanozyten

Abschließend wurde untersucht, inwiefern die Inhibition der miR-196a Expression in den normalen Melanozyten die Expression der nachgeschalteten Gene moduliert. Dazu wurden NHEMs für 48 Stunden mit LNAs (locked nucleic acids) gegen miR-196a oder einer Kontroll-miR transfiziert. Hierbei handelt es sich um Oligonukleotidanalogue, die an die Sequenz der microRNA binden und somit entweder durch sterische Inhibition der miRNA oder durch Degradation deren Funktion hemmen (Stenvang et al. 2008). Die Behandlung der NHEMs mit der anti-miR196a führte zu einer Zunahme der HOX-B7 mRNA- und Proteinexpression im Vergleich zu kontroll-transfizierten Zellen (Abbildung 4.11 A, B). Die HOX-B7 Zielgene bFGF und BMP4 wurden nach Transfektion mit der anti-miR gegen HOX-B7 ebenfalls um bis zu 100% stärker exprimiert verglichen mit kontroll-miR transfizierten NHEMs (Abbildung 4.11 A). Durch Boyden Kammer Assays konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die Behandlung mit der anti-miR-196a die Migrationsfähigkeit der NHEMs im Vergleich zu kontrollbehandelten Zellen um über 100% steigert (Abbildung 4.11 C).

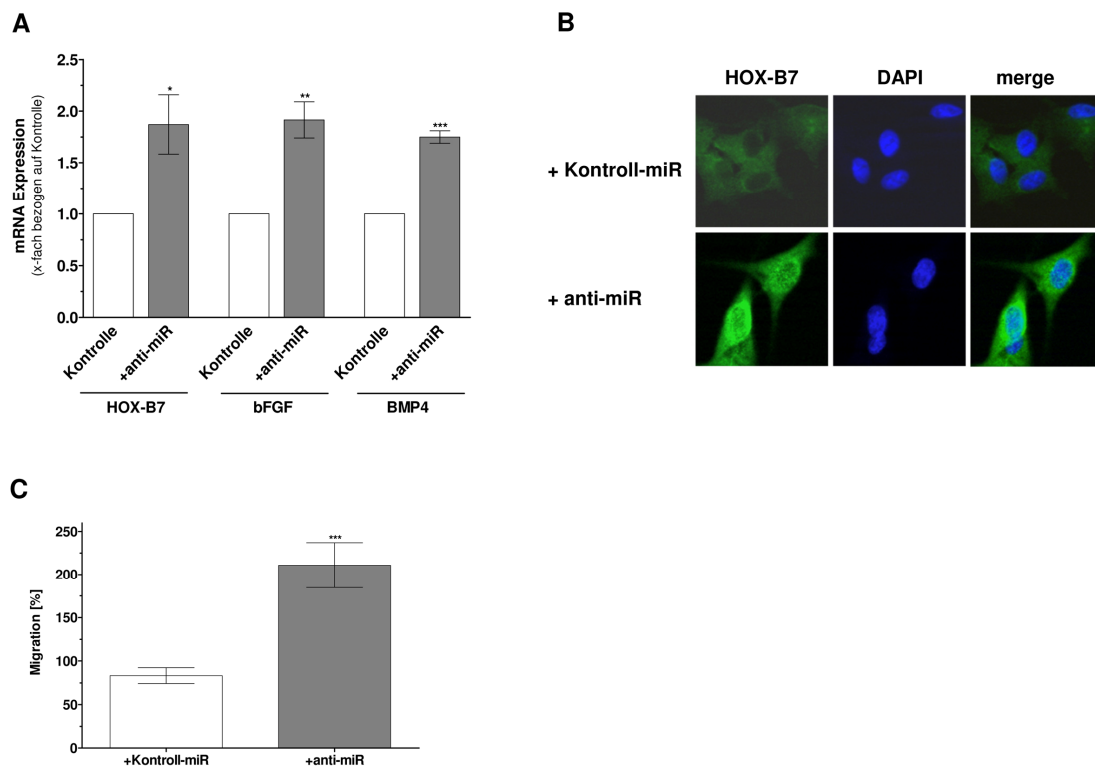


Abbildung 4.11: Einfluss der anti-miR-196a Transfektion auf die Expression der nachgeschalteten Gene in NHEMs sowie die Analyse des Migrationsverhaltens. (A) Normale Melanozyten wurden für 48 Stunden mit LNAs gegen miR-196a und einer Kontroll-miR behandelt. QRT-PCR Analysen zeigten, dass die Expression von HOX-B7, bFGF und BMP4 durch die Transfektion mit der anti-miR im Vergleich zu den Kontrollzellen um bis zu 100% zunahm. (B) Immunfluoreszenz Färbungen bestätigten die verstärkte HOX-B7 Proteinexpression in den anti-miR behandelten NHEMs. (C) Boyden Kammer Assays ergaben, dass das migratorische Verhalten der NHEMs durch die LNA gegen miR-196a positiv beeinflusst wurde. Die anti-miR behandelten NHEMs zeigten eine etwa doppelt so starke Fähigkeit zur Migration im Vergleich zu den Kontrollzellen.

Durch diesen Teil der Arbeit konnte der Regulationsmechanismus, welcher zur erhöhten Expression von BMP4 im malignen Melanom führt, aufgeklärt werden. Wie in Abbildung 4.12 dargestellt, resultiert die verminderte Expression der miR-196a in einer Überexpression des Transkriptionsfaktors HOX-B7, welcher die Expression des Wachstumsfaktors bFGF reguliert. Dieser wiederum aktiviert über Ets-1 die Expression von BMP4, was unter anderem zu einer Steigerung des migratorischen Potentials der Melanomzellen führt.

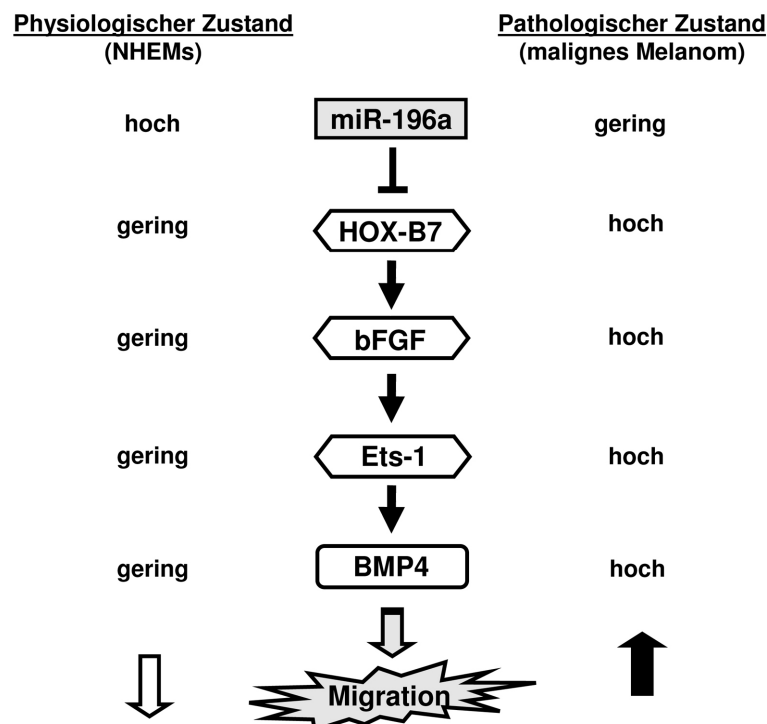


Abbildung 4.12: Schematische Darstellung des Signalweges, welcher in Melanomzellen zur Induktion der BMP4 Expression führt und dadurch das Migrationspotential der Zellen fördert.

4.2 Expression und Funktion von Dido1 im malignen Melanom

4.2.1 Identifikation neuer BMP-Zielgene

Zur Identifikation neuer Zielgene des BMP-Signalwegs wurde wie unter 6.2.2.10 beschrieben eine GeneChip® Expressionsanalyse der Firma Affymetrix (Santa Clara, USA) durchgeführt. Hierfür wurden die Melanomzelllinien Mel Im und Mel Ju mit 2 µM Dorsomorphin, bzw. DMSO als Kontrolle für 6 Stunden behandelt. Dorsomorphin inhibiert spezifisch den Smad-abhängigen BMP-Signalweg, indem es die Kinaseaktivität des BMP Typ I Rezeptor hemmt (Anderson und Darshan 2008). Durch Western Blot Analysen konnte auch in Mel Im Zellen nach Behandlung mit 2 µM Dorsomorphin eine Inhibition der Phosphorylierung und damit der Aktivierung der R-Smads detektiert werden, während die Phosphorylierung von ERK nicht beeinflusst wurde (Abbildung 4.13). Die Auswertung des cDNA-Microarrays mit den Software-Programmen ChipInspector und BiblioSphere von Genomatix (München) zeigte, dass unter den potentiellen BMP-Zielgenen das Gen Dido1 (Death inducer obliterator 1) die stärkste Regulation aufwies: Die Dorsomorphin-

behandelten Zellen zeigten im Vergleich zu den DMSO kontrollbehandelten Zellen eine etwa 4fach geringere Expression der Dido1 mRNA.

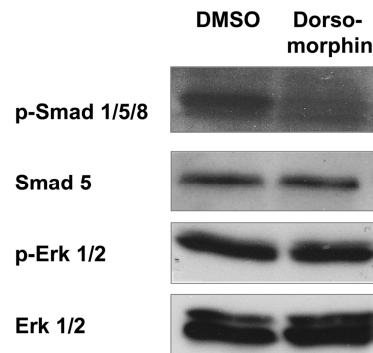


Abbildung 4.13: Analyse der BMP-Signalkaskade nach Behandlung mit Dorsomorphin. Nach Behandlung der Melanomzelllinie Mel Im mit 2 μ M Dorsomorphin konnte im Western Blot eine Reduktion der Smad 1/5/8 Phosphorylierung festgestellt werden, wohingegen die Aktivierung des Erk-Signalweges nicht moduliert wurde.

Zur Verifizierung der Microarray-Daten wurden die Zelllinien Mel Im und Mel Ju für 6 Stunden mit 2 μ M Dorsomorphin, bzw. der DMSO Kontrolle behandelt und die Expression von Dido1 mittels qRT-PCR, bzw. Immunfluoreszenz-Färbungen bestimmt. Die Dorsomorphin-behandelten Melanomzelllinien wiesen im Vergleich zu den Kontrollzellen in Analogie zu den Array-Daten eine stark verminderte Dido1 Expression sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene auf (Abbildung 4.14 A, B).

Da besonders BMP4 im malignen Melanom eine bedeutende Rolle spielt, wurde die potentielle Regulation von Dido1 durch BMP4 untersucht. Dazu wurden Zellklone verwendet, welche durch Einbringen eines antisense Konstruktes eine Inhibition der BMP4 Expression aufwiesen. In diesen Klonen sollte die Expression von potentiellen BMP-Zielgenen stark vermindert sein. In den asBMP4 Klonen zeigte sich eine über 50% geringere Dido1 mRNA Expression im Vergleich zu den kontroll-transfizierten Mel Im Zellen (Abbildung 4.14 C). Somit konnten die Ergebnisse des Microarrays auch experimentell bestätigt werden und Dido1 als Zielgen des Smad-abhängigen BMP Signalweges identifiziert werden.

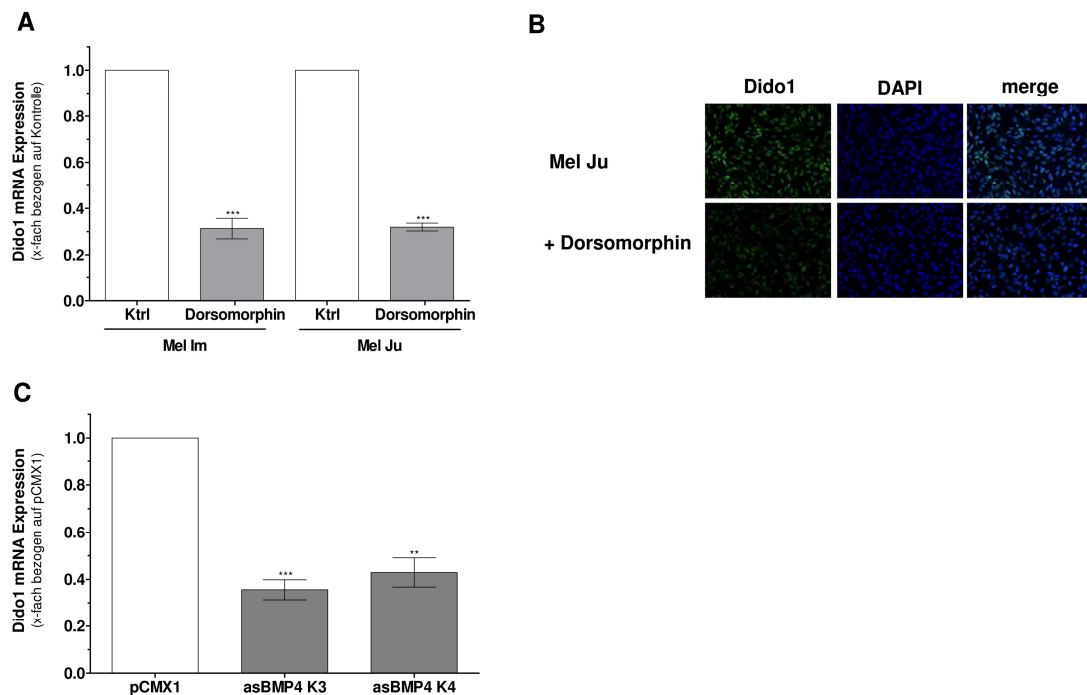


Abbildung 4.14: Einfluss der Inhibition des BMP-Signalweges auf die Dido1 Expression. (A) Die Behandlung von Mel Im Zellen (links) und Mel Ju Zellen (rechts) mit dem BMP-spezifischen Inhibitor Dorsomorphin verringerte die Dido1 mRNA Expression im Vergleich zur Kontrolle um über 60%. (B) Auch auf Proteinebene konnte die verminderte Dido1 Expression in den Dorsomorphin-behandelten Mel Ju Zellen nachgewiesen werden. (C) Zusätzlich zeigte sich in asBMP4 Zellklonen im Vergleich zu den pCMX1-Kontrollzellen eine etwa 50%ige Reduktion der Dido1 Expression.

4.2.2 Expression von Dido1 im malignen Melanom

Dido1 wird im humanen System in drei unterschiedlichen Isoformen exprimiert. Um die Relevanz der verschiedenen Dido1 Isoformen im malignen Melanom zu untersuchen, wurde mit Hilfe von spezifischen Primern die Expressionsstärke der jeweiligen Isoformen in Mel Im Zellen bestimmt. Es zeigte sich, dass die Isoform 3 im Vergleich zu den Isoformen 1 und 2 ein sehr hohes Dido1 mRNA-Level aufwies (Abbildung 4.15). Da die Isoformen 1 und 2 im Melanom kaum exprimiert werden, wurde in den nachfolgenden Experimenten nur die Isoform 3 eingehender untersucht.

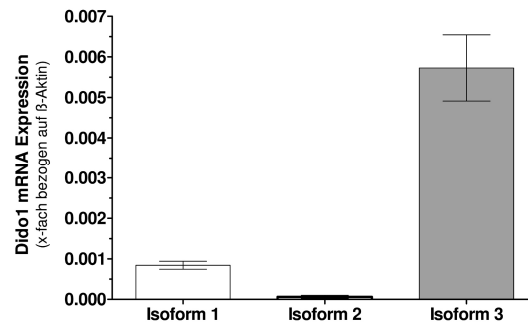


Abbildung 4.15: Expressionsstärke der verschiedenen Dido1 Isoformen im malignen Melanom. Mit Hilfe von spezifischen Dido1 Primern, welche nur die jeweilige Isoform erkennen, konnte in Mel Im Zellen dargestellt werden, dass die Isoform 3 im Vergleich zu den Isoformen 1 und 2 des Dido1 Transkripts eine sehr hohe mRNA Expression aufwies.

Im nächsten Schritt wurde die Expression von Dido1 in verschiedenen Melanomzelllinien untersucht. Es zeigte sich insbesondere in den Zelllinien, welche von Metastasen abstammten, eine Hochregulation der Dido1 mRNA Expression im Vergleich zu normalen Melanozyten. Die Zelllinien, welche aus Primärtumoren generiert wurden, wiesen, abgesehen von den Mel Juso Zellen, eine den NHEMs vergleichbare Dido1 mRNA Expression auf. (Abbildung 4.16 A). Auf Proteinebene hingegen konnte sowohl in primären als auch in metastatischen Zelllinien eine deutlich verstärkte Dido1 Expression mittels Immunfluoreszenz Färbungen nachgewiesen werden. Die Melanomzellen zeigen eine spezifische Dido1 Kernfärbung, wohingegen die NHEMs keine Dido1 Proteinexpression aufweisen (Abbildung 4.16 B).

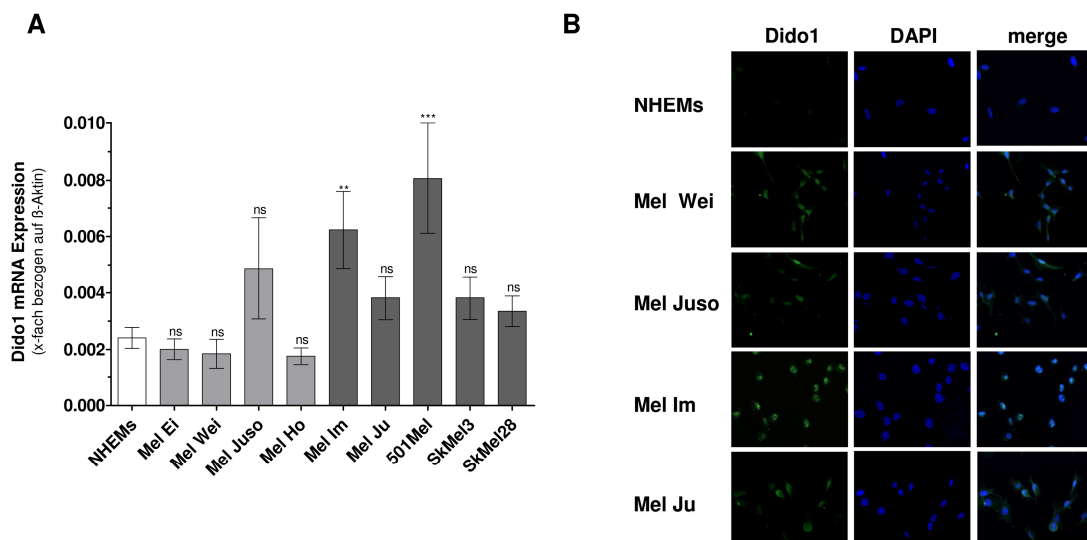


Abbildung 4.16: Dido1 Expression in Melanomzelllinien. (A) Die Melanomzelllinien aus Metastasen (schwarze Balken) wiesen im Vergleich zu den Melanozyten (NHEMs) eine leicht erhöhte mRNA Expression von Dido1 auf, wohingegen die Dido1 mRNA Expression in der Mehrzahl der Zelllinien, welche aus Primärtumoren stammen (graue Balken), im Vergleich zu den NHEMs keine differentielle Genregulation zeigten. (B) Durch Immunfluoreszenz Färbungen konnte in allen Melanomzelllinien eine deutliche nukleäre Dido1 Proteinexpression nachgewiesen werden.

Um die differentielle Expression von Dido1 auch *in vivo* zu bestätigen, wurde die mRNA Expression des BMP-Zielgens in Gewebeproben von Primärtumoren und Metastasen, welche aus Lymphknoten, Kieferhöhle und Haut isoliert wurden, bestimmt. Die Gewebeproben von jeweils 4 Primärtumoren und Metastasen zeigten im Vergleich zu Melanozyten eine sehr starke Dido1 Überexpression (Abbildung 4.17 A). Für den Nachweis der Proteinexpression in den verschiedenen Stadien der Melanomprogression wurden diverse Gewebeschnitte immunhistochemisch mit einem gegen Dido1 gerichteten Antikörper angefärbt. Bereits in den frühen Phasen der Entstehung des malignen Melanoms konnte eine starke Dido1 Expression detektiert werden (Abbildung 4.17 B, I und II). Ebenso zeigten auch die Primärtumore und Metastasen eine intensive Dido1 Kernfärbung (Abbildung 4.17 B, III-VI).

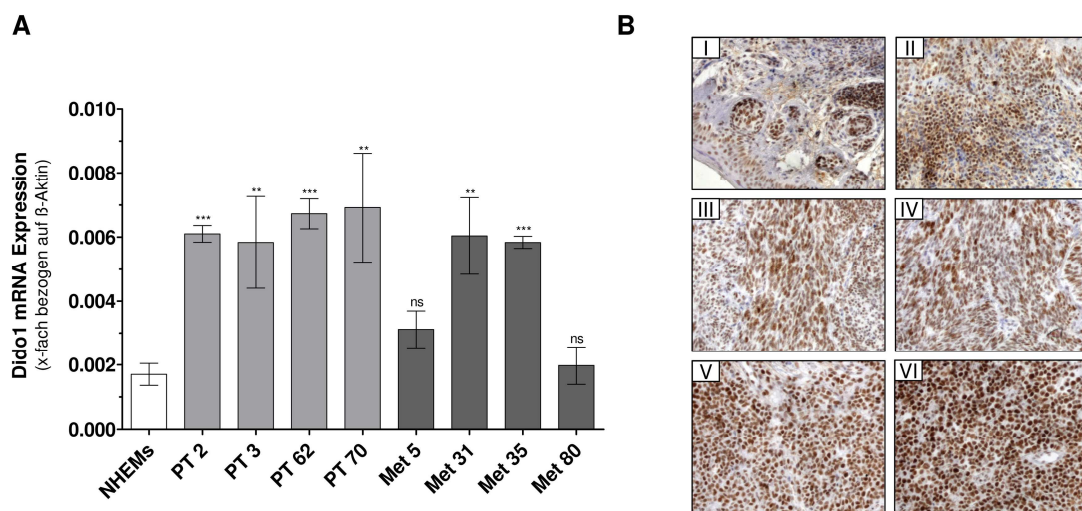


Abbildung 4.17: Expression von Dido1 in Gewebeproben. (A) Gewebeproben aus verschiedenen Primärtumoren (PT, graue Balken) und Melanommetastasen (Met, schwarze Balken) zeigten eine signifikant erhöhte Dido1 mRNA Expression im Vergleich zu normalen Melanozyten. (B) Auch in immunhistochemischen Färbungen konnte die Expression von Dido1 nachgewiesen werden. Repräsentative Bilder zeigen je zwei Färbungen von Navi (I und II), Primärtumoren (III und IV) und Melanommetastasen (V und VI).

4.2.3 Funktionelle Relevanz von Dido1 im malignen Melanom

Um die Funktion von Dido1 in malignen Melanom zu untersuchen, wurden Mel Im und Mel Ju Zellen für 72 Stunden mit zwei unterschiedlichen siRNAs gegen Dido1 und einer 1:1 Mischung beider siRNAs transfiziert. Die Transfektion von Mel Im Zellen mit den verschiedenen siRNAs führte zu einer etwa 50%igen Inhibition der Dido1 mRNA Expression, in Mel Ju Zellen hingegen konnte die Dido1 mRNA Expression um bis zu 80%

reduziert werden (Abbildung 4.18 A,B). Auf Proteinebene zeigte sich ebenfalls die verminderte Expression von Dido1 nach Transfektion mit den spezifischen Dido1 siRNAs, wie in Abbildung 4.18 C durch Immunfluoreszenz Färbungen an Mel Ju Zellen dargestellt werden konnte.

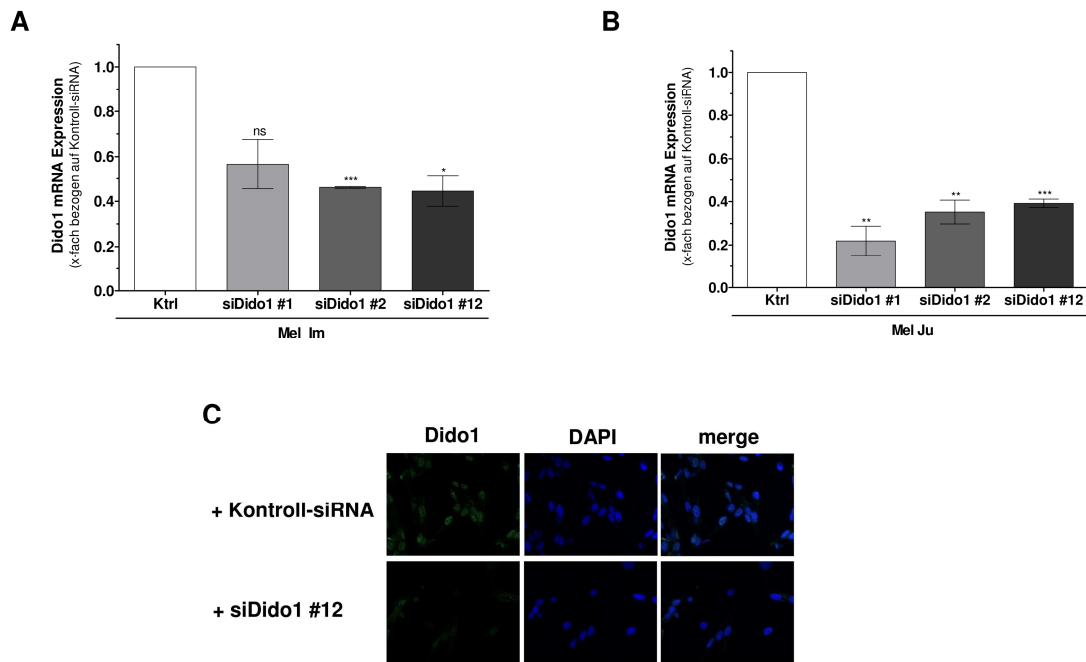


Abbildung 4.18: Inhibition der Dido1 Expression mit Hilfe von verschiedenen siRNAs gegen Dido1. QRT-PCR Analysen von (A) Mel Im und (B) Mel Ju Zellen zeigten, dass die Transfektion mit verschiedenen siRNAs gegen Dido1 (siDido1 #1, siDido1 #2 und siDido1 #12) in einer starken Reduktion der Dido1 mRNA Expression resultiert. (C) Die siDido1 #12 transfizierten Mel Ju Zellen wiesen im Vergleich zu kontroll-transfizierten Zellen eine verringerte Dido1 Proteinexpression auf.

4.2.3.1 Einfluss von Dido1 auf Attachment und Proliferation von Melanomzellen

Zu Beginn der funktionellen Untersuchungen wurde der Effekt von Dido1 auf das Attachment der Melanomzellen analysiert. Dazu wurden Mel Ju Zellen mit den spezifischen siRNAs gegen Dido1 transfiziert und nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden in das xCelligence Gerät von Roche (Mannheim) eingesetzt (siehe 6.2.4.7). Die siDido1 transfizierten Mel Ju Zellen zeigten eine über 50% verminderte Adhäsion (Abbildung 4.19).

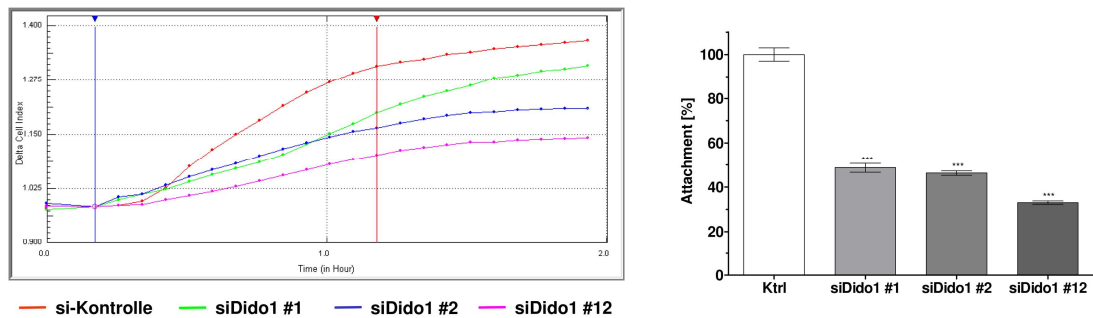


Abbildung 4.19: Attachment der Melanomzellen nach Transfektion mit spezifischen siRNAs gegen Dido1. Das im xCelligence untersuchte Attachment von siDido1 transfizierten Mel Ju Zellen war im Vergleich zu Kontroll-siRNA transfizierten Zellen stark reduziert. Der linke Teil der Abbildung zeigt die xCelligence Analyse, wobei die Änderung der Zelldichte (Zellindex) im Verhältnis zur Zeit aufgetragen ist. Nach dem Einsetzen der Zellen in das Gerät wurden die Kurven auf den Wert 1 normalisiert. Im rechten Teil der Abbildung ist die Auswertung der xCelligence Analyse im Balkendiagramm dargestellt. Hierbei wurden die jeweiligen Steigungen des Zellindexes zwischen den im Graph links markierten Zeitpunkten berechnet und relativ zum Wert der Kontroll-siRNA aufgetragen.

Mehrere Studien zeigten, dass BMPs auch die Proliferationsfähigkeit verschiedener Zellen fördern (Pountos et al. 2010; King und Hughes 2001). Daher wurde der Einfluss des BMP-Zielgenes Dido1 auf das Wachstum der Melanomzellen untersucht. Wie in Abbildung 4.20 dargestellt, führte der Knockdown von Dido1 mit den verschiedenen siRNAs zu keiner eindeutigen Hemmung der Proliferation der Mel Ju Zellen. Es zeigte sich, dass die siRNA #1 keinen Effekt auf die Verdopplungsrate der Zellen ausübte, wohingegen das Proliferationsverhalten der Zellen durch Transfektion mit der siRNA #2 stark inhibiert wurde. Die Transfektion mit beiden siRNAs resultiert in einer leicht erhöhten Verdopplungszeit.

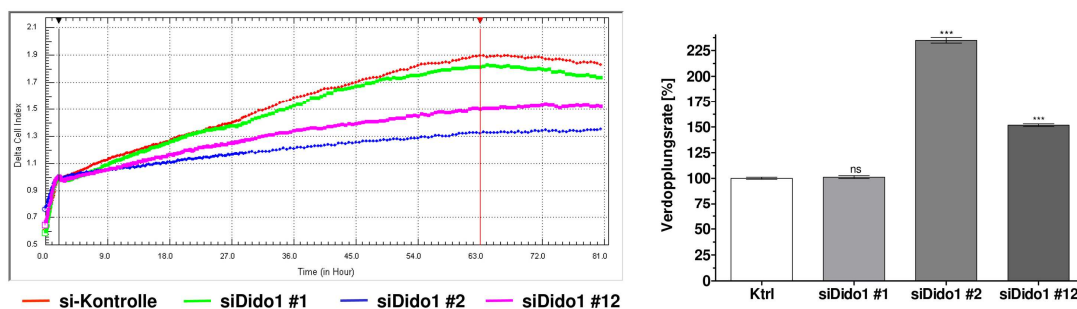


Abbildung 4.20: Einfluss der Dido1 siRNA Transfektion auf die Proliferation. Die Transfektionen mit den siRNAs gegen Dido1 wiesen unterschiedliche Effekte auf das Proliferationsverhalten der Mel Ju Zellen auf. Während die siRNA #1 keine Auswirkung auf die Proliferationsrate der Zellen zeigte, resultierte die Behandlung mit der siRNA #2 in einer deutlichen Inhibition der Wachstumsrate, was sich in einer Zunahme der Verdopplungszeit bemerkbar machte (rechts).

4.2.3.2 Bedeutung von Dido1 für die Migration und Invasion von Melanomzellen

Da bereits in früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen werden konnte, dass BMP4 die Migration und die Invasion der Melanomzellen steigert (Braig et al. 2010; Rothhammer et al. 2005), wurde die Migrationsfähigkeit der siDido1 behandelten Zellen mit Hilfe des Scratchassays untersucht. Dabei wurden wie unter 6.2.4.8 beschrieben, die Zellen eines Monolayers teilweise abgeschabt und anschließend die Zeit gemessen, bis die Zellen wieder in das „verletzte“ Areal einwandern. Dieser Test wurde ebenfalls im xCelligence durchgeführt. Da durch den Scratch Zellen von der Platte entfernt werden, sinkt der Messwiderstand und der damit verbundene Zellindex sehr stark ab, wohingegen das darauffolgende Einwandern der Zellen in einer stetigen Erhöhung des Zellindexes resultiert. Die Zellen, welche mit den siRNAs gegen Dido1 transfiziert wurden, wiesen im Vergleich zu den kontroll-transfizierten Mel Ju Zellen ein stark verlangsamtes Migrationsverhalten auf (Abbildung 4.21 A).

Mit Hilfe des Scratchassay kann jedoch nicht zwischen reiner Migration und Proliferation differenziert werden, da die Zellen auch aufgrund einer erhöhten Proliferationsfähigkeit in das abgeschabte Areal einwandern. Darüber hinaus erfolgt die Migration der Zellen in die Läsion im Scratchassay auf ungerichtete und willkürliche Weise, es handelt sich hierbei also vor allem um Effekte der Chemokinese. Zur Untersuchung der gerichten Migration (Chemotaxis), wurden Boyden Kammer und xCelligence Experimente durchgeführt. Hierbei handelt es sich um ein Zwei-Kammer-System, bei welchem die Zellen in Richtung eines Lockstoffes (Chemoattraktant) wandern. Beide Assays zeigten übereinstimmend, dass durch die Hemmung der Dido1 Expression das migratorische Potential der Zellen um über 50% abnahm (Abbildung 4.21 B-D).

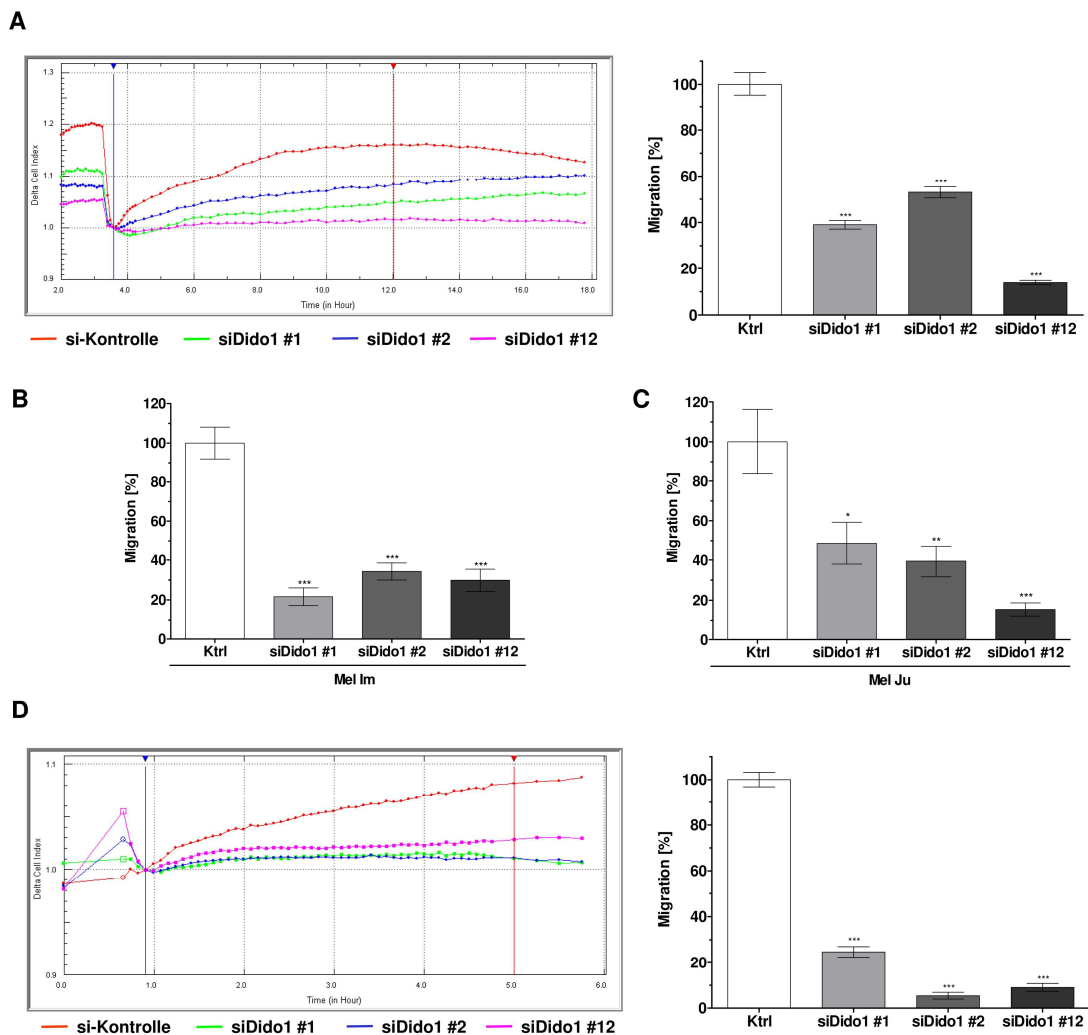


Abbildung 4.21: Die Rolle von Dido1 für die Migration der Melanomzellen. (A) Die siDido transfizierten Mel Ju Zellen zeigten im Scratchassay eine reduzierte Migrationsfähigkeit (rechts die Auswertung der Änderung des Zellindex als Balkendiagramm dargestellt). (B,C) Mit Hilfe von Boyden Kammer Assays konnte gezeigt werden, dass die Dido1 siRNA Transfektion in einer deutlichen Hemmung der gerichteten Migration der Mel Im (B) und Mel Ju (C) Zellen resultiert. (D) Das verminderte migratorische Potential der siDido transfizierten Mel Ju Zellen konnte auch in xCelligence Experimenten bestätigt werden (rechts die quantitative Auswertung des Migrationsverhaltens während des markierten Zeitraums als Balkendiagramm).

Die anschließenden Versuche zur Bestimmung des invasiven Potentials der Zellen demonstrierten ein deutlich verringertes Invasionsverhalten der Dido1 siRNAs transfizierten Melanomzellen: In Boydenkammer Assays konnte gezeigt werden, dass die Transfektion mit den Dido1 siRNAs die Invasivität der Mel Ju Zellen um etwa 60% hemmt (Abbildung 4.22 A). Um festzustellen, ob die Dido1 siRNA Transfektion auch im natürlichen Tumormilieu eine inhibierende Wirkung auf die Migrations- und Invasionsfähigkeit der Melanomzellen ausübt, wurden mit Hilfe der „Hanging drop“ Methode dreidimensionale, multizelluläre Sphäroide hergestellt (siehe 6.2.4.9). Diese Sphäroide

wurden in Kollagen eingebettet und mit Fibroblasten konditioniertem Medium (FKM) inkubiert (siehe 6.2.4.10). Das durch die im FKM enthaltenen Chemoattraktanten bedingte Auswandern der Zellen aus dem Sphäroidverbund in die Kollagenmatrix wurde über die Dauer von 4 Tagen beobachtet. In Analogie zu den vorherigen Experimenten inhibierte die Transfektion mit den siRNAs gegen Dido1 das Auswandern der Mel Ju Zellen aus dem Zellverband (Abbildung 4.22 B). Somit konnte die funktionelle Relevanz der Dido1 Expression auch im dreidimensionalen System nachwiesen werden.

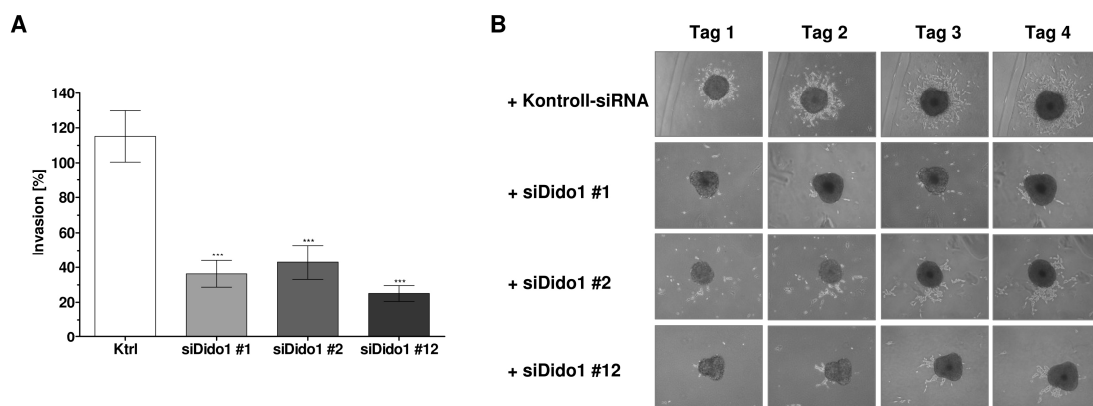


Abbildung 4.22: Dido1 beeinflusst die Invasivität von Melanomzellen im 2D- und 3D-Zellkulturmodell. (A) Boyden Kammer Assays zeigten eine deutlich verminderte Invasionsfähigkeit der siDido1 transfizierten Mel Ju Zellen im Vergleich zu den kontroll-siRNA behandelten Zellen. (B) Die mit siRNA gegen Dido1 transfizierten Mel Ju Zellen wanderten im Vergleich zu den Kontrollzellen nur sehr vereinzelt aus dem Sphäroid in die umgebende Kollagenmatrix aus.

4.2.3.3 Rolle von Dido1 für das matrix-unabhängige Wachstum der Tumorzellen

Im nächsten Versuchsabschnitt wurde die Fähigkeit der siRNA transfizierten Mel Ju Zellen zur matrix-unabhängigen Bildung von Kolonien untersucht. Dazu wurden einzelne Zellen in Softagar eingebettet und die Größe und Anzahl der sich nach zehn Tagen gebildeten Kolonien bestimmt. Der Colony Forming Assay zeigte, dass die Zahl der Kolonien durch die Transfektion mit siRNAs gegen Dido1 nicht beeinflusst wurde. Hingegen wurde das matrix-unabhängige Wachstum der Mel Ju Zellen nach siDido1 Transfektion im Vergleich zur Kontrolle um bis zu 50% inhibiert (Abbildung 4.23).

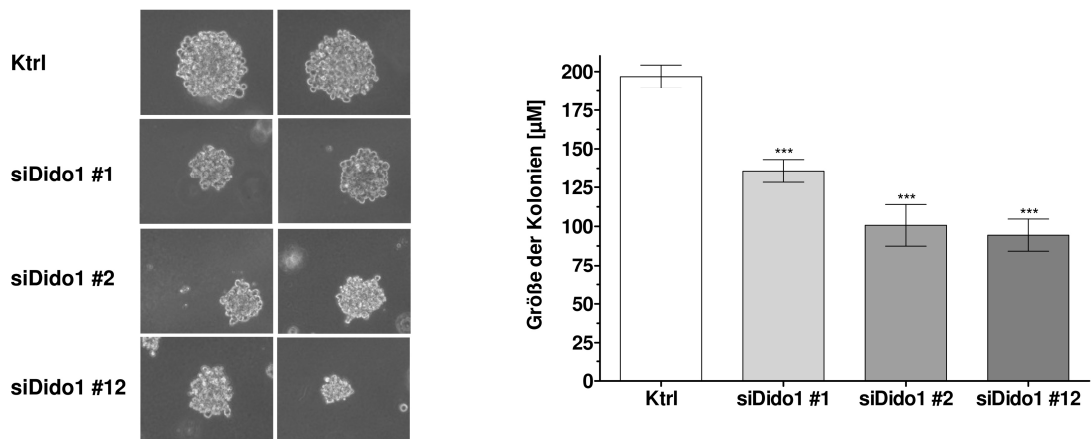


Abbildung 4.23: Einfluss von Dido1 auf das matrix-unabhängige Wachstum. Die Zellen, welche mit spezifischen siRNAs gegen Dido1 transfiziert wurden, bildeten im Vergleich zu kontroll-transfizierten Zellen signifikant kleinere Kolonien aus. Der rechte Teil der Abbildung zeigt das Ergebnis der Vermessung des Durchmessers von jeweils 15 repräsentativen Kolonien.

4.2.3.4 Einfluss der siDido1 Transfektion auf die Seneszenz der Zellen

Das verminderte matrix-unabhängige Wachstum der siDido1 transfizierten Zellen (siehe Abbildung 4.23) könnte auf einer Induktion der zellulären Seneszenz basieren. Seneszenz beschreibt den Zustand, bei welchem der Zellzyklus irreversibel gestoppt wird und die Zellen somit nicht mehr in der Lage sind sich zu teilen. Der Nachweis der Seneszenz erfolgt über die Umsetzung des Substrates X-Gal durch die Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase, was sich in einer Blaufärbung des Zytosols manifestiert.

Allerdings zeigte sich, dass die Transfektion der Mel Ju Zellen mit siRNAs gegen Dido1 zu keiner Zunahme der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase Färbung führte (Abbildung 4.24).

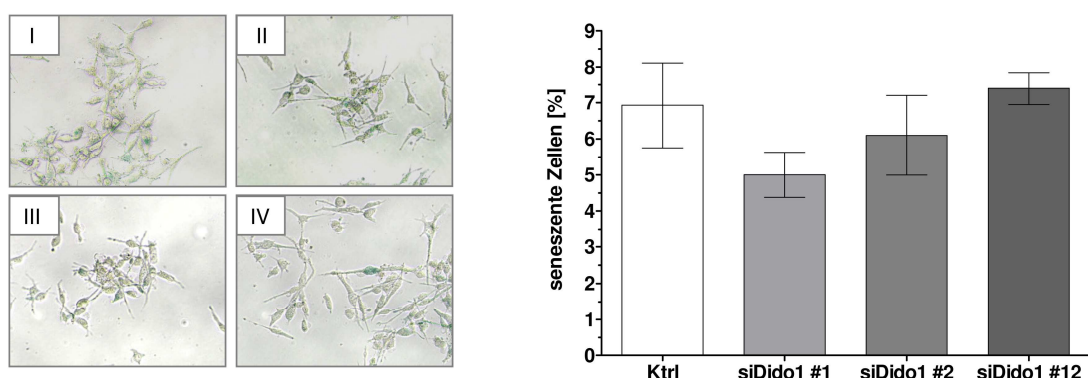


Abbildung 4.24: Einfluss der siDido1 Transfektion auf die Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase Färbung. Die Inhibition der Dido1 Expression mittels spezifischen siRNAs hatte keinen Einfluss auf die Seneszenz der Mel Ju Zellen. Der linke Teil der Abbildung zeigt repräsentative Aufnahmen von Kontrollzellen (I) und siDido1 transfizierten Zellen (siDido1 #1 -II, siDido1 #2 -III, siDido1 #12 -IV); im rechten Teil ist graphisch der prozentuale Anteil der seneszenten Zellen nach der jeweiligen Behandlung dargestellt.

4.2.3.5 Auswirkung von Dido1 auf das Apoptoseverhalten von Melanomzellen

Da in der Literatur bereits beschrieben wurde, dass Dido1 an der Regulation der Apoptose beteiligt ist (Garcia-Domingo et al. 1999; Garcia-Domingo et al. 2003), wurde der Einfluss der siDido Transfektion auf die Induktion des Zelltodes der Mel Ju Zellen untersucht. Dazu wurden die transfizierten Zellen sowohl nach 24 Stunden als auch nach 72 Stunden mit Annexin V und Phosphatidylserin (PI) angefärbt und durchflusszytometrisch im FACS analysiert. In Abbildung 4.25 ist die Fluoreszenz-intensivität von PI (y-Achse) gegen diejenige von Annexin V-FITC (x-Achse) aufgetragen. Vitale Zellen erscheinen im linken, unteren Quadranten Q3, wohingegen nekrotische Zellen eine starke PI-Färbung aufweisen und im linken, oberen Quadranten Q1 zu finden sind. Die Zellen in der frühen Phase der Apoptose sind Annexin V positiv und PI negativ und können daher im rechten unteren Quadranten Q4 detektiert werden. Da die Membran der Zellen in der späten Phase der Apoptose permeabel für PI wird, erscheinen diese zusammen mit den Zellen der frühen Nekrose im rechten oberen Quadranten Q2. Der obere Teil der Abbildung 4.25 zeigt, dass das Ausschalten der Dido1 Expression mit den spezifischen siRNAs bereits nach 24 Stunden zu einer Induktion der Apoptose der Mel Ju Zellen führt, wobei vor allem die späte Apoptose und die frühe Nekrose der Zellen betroffen war. So befanden sich 2,5% der kontroll-transfizierten Zellen in der späten Phase der Apoptose und früher Nekrose, wohingegen über 3,5% der siDido1 transfizierten Zellen Merkmale der späten Apoptose aufwiesen. Wurden die Zellen für 72 Stunden mit den Dido1 siRNAs transfiziert, so lies sich dieser Effekt noch weiter steigern (Abbildung 4.25 untere Reihe). Der Anteil der spät apoptotischen Zellen erhöhte sich durch die Transfektion mit den spezifischen siRNAs von 6% auf durchschnittlich etwa 16%.

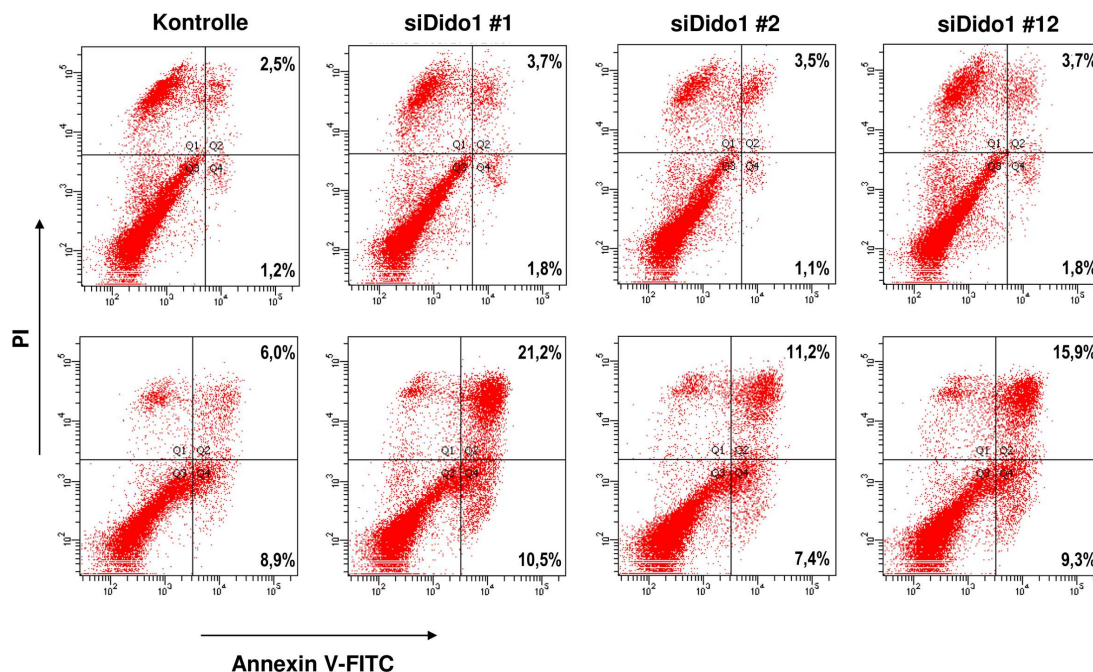


Abbildung 4.25: Der Einfluss des Knockdowns der Dido1 Expression auf die Apoptose der Mel Ju Zellen. Die Behandlung mit Dido1 siRNAs resultiert im Vergleich zur Kontrolltransfektion in einer signifikanten Erhöhung des Anteils an apoptotischen Zellen nach 24 Stunden (oben) und nach 72 Stunden (unterer Teil der Abbildung).

Um schließlich die langfristigen Effekte von Dido1 zu untersuchen, wurden stabile asDido1 Melanomzellklone generiert. Dazu wurde ein antisense Dido1 Konstrukt hergestellt und in den pcDNA3 Vektor eingebracht (siehe 6.1.6). Durch die stabile Transfektion von Mel Im Zellen mit dem antisense Konstrukt, konnte die mRNA Expression von Dido1 um über 90% im Vergleich zur pcDNA3 Kontrolle reduziert werden (Abbildung 4.26 A). Wurden die Klone allerdings über einen längeren Zeitraum kultiviert, so zeigten die asDido1 Klone wieder eine ähnlich hohe Dido1 mRNA Expression wie die Kontrollzellen (Abbildung 4.26 B). Wie in 5.2.4.5 diskutiert, lässt dies darauf schließen, dass das Ausschalten der Dido1 Expression in einer Induktion der Apoptose resultierte. Dadurch starben die antisense Dido1 Klone ab und nur die normalen Zellen waren in der Lage zu überleben.

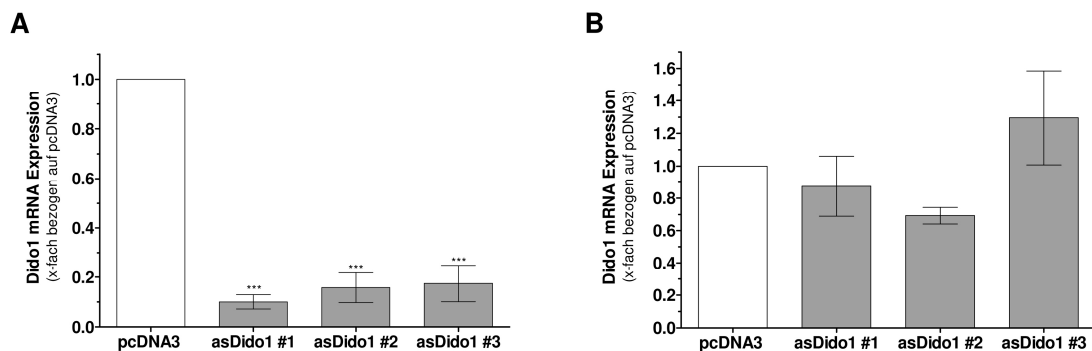


Abbildung 4.26: Dido1 mRNA Expression in stabilen antisense Dido1 Zellklonen. (A) Mel Im Zellen, welche stabil mit einem antisense Dido1 Konstrukt transfiziert wurden, zeigten im Vergleich zu den pcDNA3 Klonen eine stark verminderte Dido1 mRNA Expression. (B) Nach längerer Kultivierung konnte jedoch keine differentielle Regulation der Dido1 Expression in den asDido1 Klonen und den Kontrollzellen festgestellt werden.

Zusammengefasst konnte in diesem Teil der Arbeit ein neues Smad-abhängiges Zielgen identifiziert und charakterisiert werden. Dido1 wird im Melanom verstärkt exprimiert und fördert das Attachment, die Migration und Invasion sowie das matrix-unabhängige Wachstum der Melanomzellen. Darüber hinaus hat Dido1 eine antiapoptotische Auswirkung auf die malignen Zellen.

5 Diskussion

5.1 Die Mediatoren der BMP4 Expression im malignen Melanom

Es ist bekannt, dass BMPs eine bedeutende Rolle während der Entstehung und Progression von verschiedenen Tumorarten spielen (siehe 2.3.4). Zahlreiche Studien analysierten die Signalkaskaden, welche durch die verschiedenen BMPs aktiviert werden und beschäftigten sich bereits mit der funktionellen Bedeutung der BMPs in den unterschiedlichen Zelltypen und –geweben. So konnte für das maligne Melanom bereits gezeigt werden, dass die Hochregulation der BMPs unter anderem die Migration und Invasion der Zellen fördert. Allerdings konnten die Regulationsmechanismen, welche zur verstärkten Expression der BMPs im Melanom führen, bis dato nur sehr unzureichend aufgeklärt werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher die molekularen Mechanismen, welche in einer Induktion der BMP4 Expression resultieren, aufgeklärt werden.

5.1.1 Der basic Fibroblast Growth Factor reguliert über Ets-1 die Expression von BMP4

Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits in früheren Untersuchungen zeigen, dass die Expression von BMP4 im malignen Melanom auf transkriptioneller Ebene reguliert wird: Mit Hilfe von computerbasierten Promotoranalysen konnten mögliche Bindestellen für zahlreiche Transkriptionsfaktoren, darunter AP-2 und Ets-1, identifiziert werden. Nähere Untersuchungen zeigten, dass AP-2 als negativer Regulator der Aktivität des BMP4-Promotors fungiert und somit die Expression von BMP4 hemmt. Folglich führt der Verlust der AP-2 Expression im malignen Melanom zu einer erhöhten Expression von BMP4 (Rothhammer et al. 2005). Weiterhin konnte bereits 2004 eine verstärkte Expression und Aktivität des Transkriptionsfaktors Ets-1 im malignen Melanom *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden. Es zeigte sich, dass die Herunterregulation der Ets-1 Expression die BMP4-Promotor Aktivität sowie die Expression von BMP4 stark vermindert. Durch die Induktion der Expression von Integrin $\beta 3$, uPA sowie verschiedenen MMPs fördert Ets-1 die Angiogenese und die Invasion der Melanomzellen (Rothhammer et al. 2004). Daneben resultiert die verstärkte Aktivität des Transkriptionsfaktors Ets-1 in einer erhöhten Expression von BMP4, was die Migrations- und Invasionsfähigkeit der Melanomzellen stimuliert (Rothhammer et al. 2005). Diese Daten deuten darauf hin, dass an der Regulation der BMP4 Expression vermutlich weitere Interaktionspartner und

Transkriptionsfaktoren beteiligt sind. In Folge dessen wurden im Rahmen dieser Arbeit die zugrunde liegenden Mechanismen untersucht, welche über den Transkriptionsfaktor Ets-1 die Expression und die Aktivität von BMP4 induzieren.

Iwasaka und Kollegen konnten zeigen, dass die Mitglieder der fibroblast growth factor Familie (FGF) die Expression von Ets-1 in Endothelzellen induzieren (Iwasaka et al. 1996). Nach Stimulation von immortalisierten Endothelzellen mit basic FGF (bFGF) stieg die Expression von Ets-1 an. Zusätzlich konnte mittels EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) die direkte Interaktion von bFGF und Ets-1 nachgewiesen werden (Iwasaka et al. 1996). Darüber hinaus fördert bFGF über Ets-1 die Promotoraktivität von MMP1 in Osteoblasten und trägt somit zur Umstrukturierung der Knochen bei (Newberry et al. 1997). Zur Untersuchung einer potentiellen Interaktion zwischen bFGF, Ets-1 und BMP4 wurden im Rahmen dieser Arbeit Melanomzelllinien mit einem Ets-1, bzw. BMP4 Reporterkonstrukt mit einem bFGF Expressionsplasmid ko-transfiziert. Es zeigte sich, dass sowohl die Promotoraktivität von Ets-1 als auch diejenige von BMP4 sehr deutlich anstieg. Darüber hinaus resultierte die Transduktion von Melanozyten und Melanomzellen mit einem bFGF exprimierenden Adenovirus in einer starken Induktion der BMP4 Expression, wohingegen die Transfektion mit einer siRNA gegen bFGF zu einer über 50%igen Herunterregulation der BMP4 Expression führte. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass der Wachstumsfaktor bFGF über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Ets-1 die Expression von BMP4 fördert.

5.1.2 Der Homeobox-Faktor HOX-B7 induziert die Expression von bFGF

Um die Signalkaskade, welche in einer verstärkten BMP4 Expression im Melanom resultiert, weiter aufzuklären, wurde im nächsten Schritt untersucht, wie der Wachstumsfaktor bFGF reguliert wird. Carè und Kollegen beschrieben bereits, dass der Homeobox-Faktor HOX-B7 die Expression von bFGF im Melanom induzieren kann. Die Autoren analysierten die mRNA Expression der Gene des HOX-B Clusters in 25 verschiedenen Melanomzelllinien und detektierten, dass lediglich HOX-B7 in allen untersuchten Zelllinien exprimiert wurde. Diese Ergebnisse konnten auch *in vivo* mit Hilfe von *in situ* Hybridisierungen bestätigt werden. Weiterhin resultierte die Hemmung der HOX-B7 Expression mittels antisense Technik in einer stark verminderten Proliferationsrate sowie einer reduzierten Expression von bFGF (Care et al. 1996). Basierend auf diesen Studien wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression von HOX-B7 in mehreren Melanomzelllinien untersucht. Erstmals gelang es, die verstärkte HOX-B7 Expression in Melanomzellen auch auf Proteinebene nachzuweisen. Weiterhin zeigte die Transfektion mit verschiedenen siRNAs gegen HOX-B7 eine verminderte Expression von bFGF und dem

nachgeschalteten Gen BMP4. Durch diese Versuche konnte belegt werden, dass die Überexpression von HOX-B7 im Melanom zu einer Induktion der bFGF Expression führt, was wiederum den Transkriptionsfaktor Ets-1 aktiviert. Die daraus resultierende Hochregulation der BMP4 Expression fördert die Migration und damit die Progression des malignen Melanoms.

Mehrere Studien an unterschiedlichen Tumorzellen belegten ebenfalls eine abnorme Expression von HOX-B7. So konnte unter anderem im Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle gezeigt werden, dass die Überexpression von HOXB7 die Proliferation der Zellen fördert und dadurch mit einer schlechten Prognose korreliert (De Souza Setubal Destro et al. 2010). Ferner weisen etwa 50% aller invasiven Mammakarzinome eine übermäßige HOX-B7 mRNA Expression auf, was die Progression des Karzinoms positiv beeinflusst (Wu et al. 2006). In Analogie zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit konnten Carè und Kollegen in Mammakarzinomzellen ebenfalls einen Zusammenhang zwischen bFGF und HOX-B7 nachweisen. Dabei zeigten sie, dass die Transduktion der Zellen mit einem retroviralen HOX-B7 Vektor zu einer deutlichen Induktion der bFGF Expression führt. Dies resultiert wiederum in einem Anstieg der Zellproliferation und der Fähigkeit, Kolonien zu bilden (Care et al. 1998). Neben bFGF konnten überdies weitere HOX-B7 Zielgene identifiziert werden, welche die Invasion und Tumorangiogenese stimulieren. Dazu zählen proangiogenetische Faktoren wie VEGF, CXCL1 (MGSA, melanoma growth stimulatory activity), Interleukin-8 und Angiopoetin-2 sowie Matrix-abbauende Proteine wie MMP9 (Care et al. 2001).

Des Weiteren weisen im malignen Melanom neben HOX-B7 weitere HOX-Gene ein verändertes Expressionsmuster auf. So konnte beispielsweise von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die Überexpression von HOX-C8 im Melanom zu einer verminderten Expression von Cadherin11 und Calponin-1 führt (Mueller und Bosserhoff 2010). Darüber hinaus konnten Maeda und Kollegen eine erhöhte mRNA Expression von HOX-A11, HOX-A13, HOX-B9, HOX-D12 und HOX-D13 in Melanomen im Vergleich zu benignen Nävi detektieren. Im Verlauf der Tumorprogression zeigte sich außerdem eine verstärkte Expression von HOX-A1, HOX-A2, HOX-C4 und HOX-B13 (Maeda et al. 2005). Diese zahlreichen Untersuchungen belegen, dass die HOX-Gene eine wichtige Rolle bei der malignen Transformation und der Progression verschiedener Krebsarten spielen. Im Falle des malignen Melanoms konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die verstärkte Expression von HOX-B7 über mehrere Zwischenschritte die Expression von BMP4 fördert.

5.1.3 Die HOX-B7 Expression wird durch die MicroRNA miR-196a reguliert

Yekta und Kollegen beschrieben in HeLa Cervixkarzinomzellen, dass die microRNA miR-196a die Expression des HOX-Genes HOX-B8 inhibiert (Yekta et al. 2004). MicroRNAs sind kleine, etwa 22 Nukleotide lange RNA-Moleküle, welche durch Bindung an die 3'UTR ihrer Zielgene deren Expression reprimieren. Die Arbeitsgruppe um Yekta zeigte, dass die miR-196a eine starke Komplementarität zu den Transkripten von HOX-B8, HOX-C8 und HOX-D8 besitzt. Durch Reporteragen-Analysen mit einem HOX-B8 3'UTR Konstrukt konnte eine direkte Bindung der miR-196a an die HOX-B8 mRNA nachgewiesen werden, was in einer Inhibition der HOX-B8 mRNA Expression resultiert (Yekta et al. 2004). Da die Sequenzen der miR-196a und HOX-B8 eine nahezu perfekte Komplementarität aufzeigen, erfolgt die miR-196a vermittelte Inhibition der HOX-B8 Expression wahrscheinlich über die Spaltung und den Abbau der HOX-B8 mRNA (siehe 2.2.4.6).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde nun untersucht, ob die Expression von HOX-B7 im malignen Melanom ebenfalls über die miR-196a reguliert sein könnte. Mit Hilfe verschiedener Computeralgorithmen konnte festgestellt werden, dass die 3'UTR von HOX-B7 tatsächlich potentielle Bindestellen für die miR-196a enthält. Ein weiterer Hinweis auf eine miR-196a vermittelte Inhibition der HOX-B7 Expression zeigte sich im inversen Expressionsprofil der beiden Moleküle: Die Expression der miR-196a ist im Melanom im Vergleich zu den normalen Melanozyten stark herunterreguliert, wohingegen die mRNA von HOX-B7 überexprimiert wird. Um die direkte Interaktion der miR-196a mit HOX-B7 zu analysieren, wurden normale Melanozyten mit einem Reporter Konstrukt, welches eine wildtyp HOX-B7 3'UTR beinhaltetete, transfiziert. Es zeigte sich, dass die Luziferase Aktivität in diesen Zellen stark vermindert war. Dagegen resultierte die Transfektion der Melanozyten mit einem Konstrukt mit mutierter HOX-B8 3'UTR in keiner Veränderung der Luziferase Aktivität. Diese Ergebnisse belegen eindeutig, dass die miR-196a an die 3'UTR bindet und dadurch die weitere Prozessierung des Transkripts inhibiert. Zur weiteren Analyse wurden miR-196a Expressionsplasmide generiert.

Um auszuschließen, dass die miR-196a-1 und die miR-196a-2 unterschiedliche Auswirkungen auf die Regulation der HOX-B7 Expression aufweisen, wurden beide miR-196a Loki getrennt kloniert. Es zeigte sich, dass die Expression der maturen miR-196a in den stabil transfizierten miR-196a-1 Zellklonen etwas höher war als in den miR-196a-2 Melanomzellklonen. Da die klonierten DNA-Fragmente eine unterschiedliche Länge aufweisen, ist dieser Effekt vermutlich auf die flankierenden Sequenzen der Seed-Sequenz zurückzuführen, welche die Prozessierung der pre-miR beeinflussen. Die stabile Transfektion mit den unterschiedlichen miR-196a Expressionsplasmiden zeigte dennoch eine ähnlich starke Inhibition der HOX-B7 Expression sowie eine stark verminderte Expression

der nachgeschalteten Gene bFGF und BMP4. Umgekehrt führte die Inhibition der hohen miR-196a Expression in normalen Melanozyten mit Hilfe von anti-miRs zu einer signifikanten Steigerung der Expression der Zielgene bFGF und BMP4. Mit Hilfe von diesen Experimenten konnte dargestellt werden, dass die verminderte Expression der miR-196a im Melanom zu einer verstärkten HOX-B7 Expression führt, was wiederum die Aktivität des Wachstumsfaktors bFGF induziert. Die daraus resultierende erhöhte Expression des Transkriptionsfaktors Ets-1 induziert anschließend die Expression von BMP4.

Bis dato ist jedoch nicht bekannt, was die stark verminderte Expression der miR-196a im Melanom bedingt. Wie bereits in 2.2.4.6 beschrieben, kann die Expression von microRNAs durch verschiedene Mechanismen reguliert werden. Die Promotorregionen der microRNA Gene enthalten ähnlich zu den Promotoren der protein-kodierenden Gene verschiedene regulatorische Elemente wie CpG Inseln, TATA-Box Sequenzen und Initiationselemente. Somit kann die Aktivität der miRNA Promotoren ebenfalls durch Transkriptionsfaktoren, Enhancermoleküle und Methylierungen reguliert werden (Krol et al.). In Lymphomzellen konnte beispielsweise gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor MYC sowohl die Expression des onkogen wirkenden miR-17-92 Clusters fördert als auch die Expression verschiedener miRNAs, welche als Tumorsuppressoren wirken (miR-15a, miR-16, miR-22), inhibiert (Chang et al. 2008). Weiterhin ist bekannt, dass die DNA Methyltransferasen DNMT1 und DNMT3b die Promotoraktivität der microRNAs let-7, miR-148a, miR-34b/c und miR-9 (Han et al. 2007) im Kolonkarzinom hemmen. Aber auch chromosomale Aberationen könnten ursächlich für die verminderte Expression der miR-196a sein. Die miR-196a-1 Sequenz ist zwischen HOX-B9 und HOX-B13 lokalisiert, die miR-196a-2 befindet sich zwischen HOX-C9 und HOX-C10 (Lagos-Quintana et al. 2003). Da im malignen Melanom in diesen Regionen keine genomischen Deletionen bekannt sind, ist diese Art der Regulation eher unwahrscheinlich. De Martino und Kollegen zeigten, dass die Expression der miR-196a-2 durch das Chromatin-assoziierte Nicht-Histon Protein HMGA1 reguliert wird. Mit Hilfe von knockout Studien konnte dargestellt werden, dass HMGA1 dabei als positiver Regulator der miR-196a-2 Expression wirkt. Des weiteren belegten ChiP-Analysen eine direkte Bindung von HMGA1 an die Promotorregion der miR-196a-2 (De Martino et al. 2009). Da die Expression von HMGA1 im Melanom bisher noch nicht detailliert untersucht wurde, ist zum jetzigen Zeitpunkt unklar, ob die verminderte miR-196a Expression auf einer Reduktion der Expression von HMGA1 beruht.

5.1.4 Funktionelle Auswirkungen des Verlustes der miR-196a Expression auf das maligne Melanom

Frühere Studien zeigten bereits, dass BMP4 unter anderem die Migration der Melanomzellen induziert (Rothhammer et al. 2005). Nachdem in dieser Arbeit dargestellt werden konnte, dass die miR-196a die Expression von BMP4 beeinflusst, wurden die miR-196a re-exprimierenden Zellklone auf ihr migratorisches Verhalten untersucht. Es zeigte sich dabei, dass die Migrationsfähigkeit der miR-196a Klone im Vergleich zu den Kontrollzellen um etwa 50% reduziert war. Darüber hinaus wiesen Melanozyten, welche mit anti-miRs gegen miR-196a behandelt wurden, eine deutliche Induktion der Migration auf. Durch diese Experimente konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass die verminderte Expression der miR-196a in malignen Melanom zu einer erhöhten Migrationsfähigkeit der Zellen führt. In weiteren Analysen wurde der genaue Mechanismus der Induktion der Migration untersucht. Es ist bekannt, dass sowohl bFGF als auch BMP4 für die Induktion der Migration verantwortlich sind. So konnte in verschiedenen Studien festgestellt werden, dass bFGF die Proliferation und die Migration von Melanomzellen fördert: Nach der Transplantation von B16-BL6 Melanomzelllinien in Mäuse wurde einmalig bFGF injiziert. Es zeigte sich, dass über die Induktion der VEGF mRNA Expression das Tumorstroma stark anstieg. Durch die zusätzliche Injektion mit einem VEGF-neutralisierendem Antikörper konnten diese bFGF-vermittelten Effekte gehemmt werden (Tsunoda et al. 2007). Des Weiteren resultierte die Behandlung von Melanomzellen mit einem anti-bFGF-Antikörper in einer Hemmung der Proliferation und Migration von B16-Zellen, einer Induktion der Apoptose sowie verminderter Angiogenese *in vitro* und *in vivo* (Li et al. 2010). Diese Ergebnisse konnten durch Experimente im Rahmen der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Dabei wurden Melanomzellen mit einem inhibitorischen bFGF Antikörper behandelt und anschließend in Boyden Kammern untersucht. Es zeigte sich, dass die Migrationsfähigkeit der Zellen, welche mit dem inhibitorischen bFGF Antikörper inkubiert wurden, im Vergleich zu Kontrollzellen sehr stark reduziert wurde. Somit konnte dargestellt werden, dass bFGF ein bedeutender Faktor für die Induktion der Migration darstellt. Darüber hinaus ist in der Literatur beschrieben, dass neben bFGF auch BMP4 die Migration und Proliferation von verschiedenen Zelltypen fördert. Es konnte gezeigt werden, dass die Transfektion von Kolonkarzinomzellen mit siRNAs gegen BMP4 zu einer Inhibition des migratorischen Potentials der Zellen führt (Deng et al. 2009). Des Weiteren resultiert die Behandlung von Endothelzellen mit rekombinatem BMP4 in einer Aktivierung des VEGF-Signalweges und einer Stimulation des migratorischen Potentials (Suzuki et al. 2008). Ferner konnten Rothhammer und Kollegen demonstrieren, dass sowohl Chordin-

überexprimierende Melanomzellklone als auch antisense BMP4-Klone ein vermindertes invasives Potential aufweisen, was darauf hinweist, dass BMP4 eine bedeutende Rolle während der Invasion und Metastasierung des malignen Melanoms spielt (Rothhammer et al. 2005). Darüber hinaus induziert BMP4 die Expression verschiedener MMPs sowohl in den Melanomzellen selbst als auch in den umgebenden Fibroblasten und ist dadurch in der Lage, die Invasivität der Zellen zu fördern (Rothhammer et al. 2008). Ausgehend von diesen Publikationen wurde in der vorliegenden Arbeit die Auswirkung der BMP4 Behandlung auf die Migrationsfähigkeit der Melanomzellen untersucht. In Analogie zu den bisherigen Studien konnte dargestellt werden, dass die Inkubation mit rekombinatem BMP4 zu einer Stimulation der Migration der Melanomzellen führt. Um nun aufzuklären, welcher Wachstumsfaktor, bFGF oder BMP4, die Migrationsfähigkeit der Melanomzellen reguliert, wurden die Zellen gleichzeitig sowohl mit dem inhibitorischen bFGF Antikörper als auch mit rekombinatem BMP4 behandelt. Interessanterweise zeigte sich, dass die zusätzliche Inkubation mit BMP4 der bFGF-vermittelten Inhibition der Migration entgegen wirkt. Diese Ergebnisse belegen, dass bFGF die Migrationsfähigkeit der Melanomzellen hauptsächlich über die Induktion der BMP4 Expression beeinflusst. Infolgedessen fungiert BMP4 im malignen Melanom als bedeutender Modulator der Migration.

In weiteren Analysen wurde die Expression des BMP-Zielgens Id-1 in den miR-196a re-exprimierenden Zellklonen untersucht. Es zeigte sich eine stark verminderte Expression von Id-1 in den miR-196a Zellklonen. Es ist bekannt, dass Id-1 eine wichtige Rolle für die Angiogenese des Tumors spielt. Benezra und Kollegen konnten zeigen, dass Tumor-Xenotransplantate nicht in der Lage waren, in Id1 +/- Knockout Mäusen zu wachsen oder zu metastasieren. Darüber hinaus wiesen die Blutgefäße dieser Tiere eine abnorme Morphologie auf (Benezra et al. 2001). Basierend auf diesen Ergebnissen ist es durchaus vorstellbar, dass die miR-196a vermittelte Induktion der Id-1 Expression im malignen Melanom einen positiven Einfluss auf die Tumorprogression ausübt. Diese Hypothese zu verifizieren wird jedoch Gegenstand künftiger Untersuchungen sein.

Verschiedene Studien identifizierten weitere Zielgene der miR-196a, welche ebenfalls eine wichtige Rolle in der Progression verschiedener Tumorarten spielen. So konnten Luthra und Kollegen in Zelllinien aus Mamma-, Uterus- und Ösophaguskarzinom zeigen, dass die miR-196a die Expression von ANXA1 (Annexin A1) reguliert (Luthra et al. 2008). In diesen Zellen resultiert die verstärkte Expression von miR-196a in einer Abnahme der ANXA1 Expression. Dies führt zu einer Induktion der Zellproliferation und des Matrix-unabhängigen Wachstums, sowie einer Hemmung der Apoptose (Luthra et al. 2008). Die miR-196a kann jedoch auch abhängig vom Zell- und Gewebetyp eine tumorsuppressive Wirkung ausüben. So konnte beispielsweise nachgewiesen werden, dass die verminderte

Expression von miR-196a in der akuten myeloiden Leukämie (AML) die Hochregulation verschiedener HOX-Gene bedingt, welche an der Regulation der Tumorprogression beteiligt sind (Debernardi et al. 2007; Frohling et al. 2007).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Signalkaskade aufgeklärt werden, welche ausgehend von der miR-196a über mehrere Zwischenschritte die Expression von BMP4 induziert und dadurch die Migrationsfähigkeit der Melanomzellen begünstigt. Der Verlust der miR-196a führt zu einer verstärkten Expression von HOX-B7, was über die Induktion der bFGF Expression und die nachfolgende Aktivierung des Transkriptionsfaktors Ets-1 die BMP4 Expression fördert. Weiterhin konnte dargestellt werden, dass die positive Auswirkung von bFGF auf das migratorische Potential verschiedener Tumorzellen zumindest im malignen Melanom durch die Aktivierung der BMP4 Expression vermittelt wird.

5.2 Das BMP-Zielgen Dido1 spielt eine wichtige Rolle im malignen Melanom

5.2.1 Dido1 stellt ein Zielgen des BMP-Signalweges dar

Zahlreiche Studien zeigten bereits, dass BMPs einen wichtigen Einfluss auf die Entstehung und Progression des malignen Melanoms ausüben. So konnte nachgewiesen werden, dass die Überexpression von BMP4 die Migrations- und Invasionsfähigkeit der Melanomzellen induziert sowie die Neoangiogenese und das Tumorwachstum fördert (Rothhammer et al. 2005; Rothhammer et al. 2007).

Bis dato ist allerdings weitgehend ungeklärt, über welche Moleküle, bzw. Regulationsmechanismen diese zahlreichen onkogenen Funktionen der BMPs vermittelt werden. Bislang konnten verschiedene BMP-Zielgene identifiziert werden. So weisen Melanomzellen mit verminderter BMP-Aktivität im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen eine geringere mRNA Expression von EphA2 (epithelial cell kinase), VE-Cadherin, Id-1 (inhibitor of differentiation) und TEK/Tie-2 (tyrosine kinase receptor with Ig and EGF homology domains 2) auf (Rothhammer et al. 2007). Die Inhibition der EphA2 und VE-Cadherin Expression führt im Melanom zu einer stark verminderten Ausbildung des vaskulären Netzwerkes (Seftor et al. 2002; Hendrix et al. 2003). Ferner konnte gezeigt werden, dass Id-1 und TEK/Tie-2 ebenfalls wichtige Faktoren der Neovaskularisierung und der Angiogenese darstellen (Cavallaro und Christofori 2000; Peters et al. 2004). So hemmt die Injektion eines adenoviralen Vektors, welcher den löslichen TEK-Rezeptor enthält, das Wachstum und die Metastasierung von Melanomen in Mäusen (Lin et al.

1998). Weiterführende Analysen ergaben, dass die Behandlung von Melanomzellen mit rekombinatem BMP4 zu einer starken Induktion der Id-1 Expression führte, wohingegen die Genexpression von VE-Cadherin, EphA2 und TEK/Tie-2 nicht beeinflusst wurde (Rothhammer et al. 2007). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass VE-Cadherin, EphA2 und TEK/Tie-2 indirekte Zielgene des BMP-Signalweges im malignen Melanom darstellen, wohingegen Id-1 als direktes BMP-Zielgen wirkt. Dies konnte ebenfalls durch weitere Studien in verschiedenen Zelltypen belegt werden (Hollnagel et al. 1999; Miyazono und Miyazawa 2002). Die direkte Bindung der Smads an den *Id-1* Promotor konnte mittels Promotoranalysen verifiziert werden: Es zeigte sich, dass neben den klassischen Smad-bindenden Elementen (SREs) auch eine GC-reiche Domäne existiert, welche ebenfalls als Bindestelle für Smad1 und Smad5 dient (Katagiri et al. 2002; Korchynskyi und ten Dijke 2002; Lopez-Rovira et al. 2002).

Um weitere Zielgene des BMP-Signalweges zu identifizieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit nach Inhibition des BMP-Signalweges ein cDNA-Microarray durchgeführt. Dazu wurden Melanomzelllinien mit Dorsomorphin behandelt. Dorsomorphin wurde im Jahr 2008 durch ein Screening zur Identifizierung neuer BMP-Antagonisten entdeckt. Es zeigte sich, dass Dorsomorphin die Ausbildung der dorso-ventralen Körperachse im Zebrafisch inhibiert und somit als potentieller BMP-Inhibitor fungieren könnte. Zur genaueren Untersuchung über welchen BMP-Signalweg die inhibierende Wirkung von Dorsomorphin vermittelt wird, wurden pulmonalarterielle glatte Muskelzellen der Maus (PASMC) mit ansteigenden Konzentrationen an Dorsomorphin behandelt. Es konnte eine Inhibition der BMP-vermittelten Phosphorylierung von Smad1/5/8 nachgewiesen werden, während die Aktivierung des BMP-induzierbaren p38 Signalweges nicht beeinflusst wurde (Yu et al. 2008). Dabei bindet Dorsomorphin mit unterschiedlicher Affinität an die ATP-Bindestelle der Kinasedomäne der BMP Typ I Rezeptoren und hemmt dadurch deren Kinaseaktivität, was die spezifische Inhibition des Smad-abhängigen BMP-Signalweg bewirkt (Yu et al. 2008). In neueren Studien konnte jedoch nachgewiesen werden, dass Dorsomorphin neben dem Smad-abhängigen Signalweg auch die Erk-abhängige Signaltransduktion hemmen kann. Boergermann und Kollegen demonstrierten in prämyoblastischen Vorläuferzellen (C2C12 Zellen), dass hohe Dorsomorphin-Konzentrationen ab 5 μM die Aktivierung der p38-, Erk1/2-, Akt- und Smad-Signalkaskade inhibieren (Boergermann et al. 2010). Des Weiteren zeigt Dorsomorphin auch deutliche Effekte auf AMPK (AMP-activated kinase) sowie auf die Kinase Aktivität des VEGF Typ II Rezeptors (Hao et al.). Diese kontroversen Studien deuten darauf hin, dass der Effekt von Dorsomorphin auf die Inhibition des BMP-Signalweges vermutlich stark zelltyp- und konzentrationsabhängig ist. Um dies näher zu untersuchen, wurden Melanomzellen mit 2 μM Dorsomorphin behandelt. Anschließend

wurde die Proteinaktivität mittels Western Blots analysiert. Dabei zeigte sich, dass die Behandlung der Melanomzellen mit Dorsomorphin zu einer Inhibition der Smad-abhängigen Signalkaskade führt, wohingegen die Aktivität des Erk-Signalweges nicht beeinträchtigt wurde. Diese Daten belegen, dass die Konzentration von 2 μ M Dorsomorphin spezifisch die Smad-abhängige Signaltransduktion der Melanomzellen hemmt.

Die Genexpression der Dorsomorphin behandelten Melanomzellen wurden anschließend mit Hilfe eines Microarrays untersucht. Dabei konnten verschiedene Gene identifiziert werden, welche durch die Behandlung mit Dorsomorphin herunterreguliert wurden und somit potentielle BMP-Zielgene darstellen. Es zeigte sich, dass die Inhibition des Smad-abhängigen BMP-Signalweges in einer verminderten Expression der Gene *Dido1* (death inducer obliterator 1), *Mef2c* (myocyte-specific enhancer factor 2c), *Id1*, *Id3* und *BRCA1* (breast cancer 1) resultiert. In anschließenden RT-PCR Analysen konnten die Ergebnisse des Microarrays bestätigt werden, wobei die Expression von *Dido1* die stärkste Inhibition aufwies. Infolgedessen wurden die Expression und die Funktion dieses BMP-Zielgens im malignen Melanom in weiterführenden Analysen untersucht. Um die Expression von *Dido1* nach Inhibition des Smad-abhängigen BMP-Signalweges auch auf Proteinebene zu untersuchen, wurden Melanomzellen mit 2 μ M Dorsomorphin behandelt und anhand von Immunfluoreszenz-Färbung analysiert. Analog zu den Versuchen auf mRNA Ebene zeigte sich nach Behandlung mit dem BMP-Inhibitor ebenfalls eine deutliche Reduktion der *Dido1*-Proteinexpression, wohingegen die unbehandelten Melanomzellen eine intensive *Dido1* Immunfluoreszenz Färbung aufwiesen.

Da frühere Studien unserer Arbeitsgruppe bereits zeigten, dass besonders BMP4 eine wichtige Bedeutung für die Entstehung und Progression des malignen Melanoms hat (Rothhammer et al. 2005), wurde in anschließenden Experimenten die BMP4 abhängige Regulation der *Dido1* Expression untersucht. Dabei zeigte die Analyse der Expression von *Dido1* in Zellklonen mit verminderter BMP4 Aktivität eine stark reduzierte *Dido1* mRNA Expression. Dies belegt, dass *Dido1* in Abhängigkeit von BMP4 reguliert wird.

Obwohl die genaue Interaktion der BMPs mit *Dido1* in weiterführenden Studien noch aufgeklärt werden muss, zeigen diese Daten deutlich, dass *Dido1* ein Zielgen des Smad-abhängigen Signalweges darstellt. Durch Computeranalysen konnte bereits festgestellt werden, dass der *Dido1* Promotor potentielle Smad4 Bindestellen enthält. Ebenso weist die schnelle Reduktion der *Dido1* Expression nach Behandlung der Melanomzellen mit Dorsomorphin darauf hin, dass es sich bei *Dido1* um ein direktes Zielgen des BMP-Signalweges handelt. Diese Hypothese zu verifizieren, wird jedoch Gegenstand künftiger Untersuchungen sein.

5.2.2 Analyse der Expression der Dido1 Isoformen

Da Dido1 in verschiedenen Varianten exprimiert wird, wurde die Relevanz der einzelnen Isoformen im malignen Melanom untersucht. Es ist bekannt, dass 6 unterschiedliche Transkriptvarianten von Dido1 existieren, welche für 3 verschiedene Isoformen kodieren. Alle Isoformen sind am N-Terminus strukturell identisch, ihre Sequenz variiert jedoch am Carboxy-terminalen Rest. Die **Isoform a** wird durch die Varianten 1 und 2 kodiert und stellt mit 562 Aminosäuren die kürzeste Form dar. Der N-Terminus enthält eine PhD-Domäne, welche die Bindung von Dido1 an methylierte Histone vermittelt (Prieto et al. 2009). Die Transkriptvarianten 3 und 6 des Dido1 Gens kodieren für die **Isoform b**, welche aus 1189 Aminosäuren besteht. Dieses Protein beinhaltet neben der PhD-Domäne eine TFIIIS- sowie eine SPOC-Domäne. Der Elongationsfaktor TFIIIS bindet an die RNA-Polymerase II und fördert dadurch die Transkription. Die SPOC-Domäne (Spen paralogue and orthologe C-terminal) ist ein Charakteristikum der Spen Familie (Split ends), welche eine bedeutende Rolle während der Entwicklung spielen und die Transkription verschiedener Gene in diversen Signalwegen regulieren. Die genaue Funktion der SPOC Domäne ist bis dato allerdings unbekannt (Sanchez-Pulido et al. 2004). Die längste Spleißvariante des Dido Gens ist die **Isoform c**, auch Dido3 genannt. Das Protein besteht aus 2240 Aminosäuren und wird von den Varianten 4 und 5 kodiert. Es enthält neben den oben genannten Domänen zusätzlich eine prolin-reiche Region, welche vermutlich für die Bindung an SH3-Domänen verantwortlich ist und dadurch Protein-Protein-Interaktionen vermittelt. Daneben existiert eine kurze Arginin-reiche Region, die möglicherweise die nukleäre Lokalisation des Proteins bedingt.

Fütterer und Kollegen konnten zeigen, dass die Isoform c die am stärksten exprimierte Spleißvariante des Dido1 Gens darstellt (Fütterer et al. 2005). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte dies bestätigt werden. Auch im malignen Melanom war die Expressionsstärke der Isoform c des Dido1 Gens im Vergleich zu den kürzeren Isoformen a und b sehr viel höher. Da im malignen Melanom die Isoform c somit die Hauptrolle zu spielen scheint, wurde in den folgenden Untersuchungen nur die Expression dieser Isoform analysiert.

5.2.3 Dido1 wird im malignen Melanom verstärkt exprimiert

Die Analyse der Dido1 mRNA Expression in Melanomzelllinien, welche aus Primärtumoren isoliert wurden, zeigte im Vergleich zu normalen Melanozyten keine signifikant differentielle Regulation. Allerdings wiesen Melanomzelllinien, welche aus Melanommetastasen generiert wurden, eine deutlich erhöhte mRNA Expression von Dido1 auf.

Hingegen demonstrierten Untersuchungen auf Proteinebene, dass die Dido1 Expression bereits in den Melanomzellen aus Primärtumor verstärkt war. Dies deutet darauf hin, dass die Dido1 Expression nicht nur auf transkriptioneller Ebene, sondern zusätzlich auch durch posttranskriptionelle Mechanismen reguliert wird. Darüber hinaus demonstrierten die Immunfluoreszenz Färbungen, dass Dido1 in den Melanomzelllinien ausschließlich im Zellkern exprimiert wird. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den Studien von García-Domingo und Kollegen, die in MEFs (mouse embryonic fibroblasts) zeigten, dass Dido1 unter normalen Bedingungen im Zytoplasma lokalisiert ist und erst nach Induktion der Apoptose in den Zellkern transloziert (Garcia-Domingo et al. 1999). Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz ist, dass Dido1 abhängig vom Zelltyp in verschiedenen zellulären Kompartimenten lokalisiert ist, in denen es unterschiedliche funktionelle Auswirkungen auf die Zellen ausübt.

Anschließend wurde die Dido1 mRNA Expression in verschiedenen Melanomgeweben untersucht. Hierbei zeigte sich im Vergleich zu normalen Melanozyten eine Hochregulation von Dido1 in Primärtumor-Geweben. Nicht eindeutig war dies hingegen bei Melanomproben, welche aus metastatischen Geweben isoliert wurden. Allerdings wurde bislang nur eine sehr geringe Anzahl an Spendern untersucht. Aufgrund der daraus resultierenden hohen Spendervariabilität sind die Ergebnisse nur bedingt interpretierbar. Dennoch exprimieren die Metastasen deutlich höhere Dido1 mRNA-Levels als die Melanozyten. Weitere Untersuchungen mit einer höheren Anzahl an Spendern sind daher notwendig, um die induzierte Dido1 Genexpression in metastatischen Melanomgeweben zu verifizieren. Die verstärkte Expression von Dido1 in Primärtumoren und Metastasen konnte auch auf Proteinebene mittels immunhistochemischen Färbungen nachgewiesen werden. Weiterhin ist aufgefallen, dass bereits Nävi-Proben eine deutliche Dido-1 Kernfärbung zeigen. Dies weist darauf hin, dass Dido1 ein wichtiger Faktor für die sehr frühen Entwicklungsphasen des malignen Melanoms zu sein scheint.

5.2.4 Funktionen von Dido1 im malignen Melanom

5.2.4.1 Dido1 hat keinen Einfluss auf das Proliferationsverhalten der Melanomzellen

Ein wichtiges Charakteristikum von malignen Zellen ist die gesteigerte Proliferationsrate im Vergleich zu gesunden Zellen. Frühere Studien zeigten, dass BMPs durch die verstärkte Proliferation das Wachstum verschiedener Zelltypen fördern. So konnte beispielsweise nachgewiesen werden, dass GDF-9 das Wachstum von Prostatakarzinomzellen induziert (Bokobza et al. 2010). Weiterhin stimulieren BMPs über die Induktion der VEGF Aktivität das Wachstum von Endothelzellen und verbessern somit die Versorgung des Tumors

(Suzuki et al. 2008). Ausgehend von diesen Studien wurde mit Hilfe spezifischer siRNAs gegen Dido1 der Einfluss dieses BMP-Zielgens auf die Proliferation von Melanomzellen untersucht. Dabei zeigten sich je nach Verwendung der verschiedenen gegen Dido1 gerichteten siRNAs unterschiedliche Ergebnisse: So führte die Behandlung mit der siRNA #1 zu keiner Änderung der Proliferationsrate, wohingegen das Wachstum der siRNA #2 behandelten Zellen stark verlangsamt war. Die Kombination beider siRNAs resultierte in einer leicht erhöhten Verdopplungsrate im Vergleich zu den Kontrollzellen. Berücksichtigt man die Arbeit von Rothhammer und Kollegen, in welcher gezeigt werden konnte, dass Zellen mit verminderter BMP Aktivität keine erhöhte Proliferationsrate aufweisen (Rothhammer et al. 2005), so übt vermutlich das BMP-Zielgen Dido1 ebenfalls keinen Einfluss auf das Proliferationsverhalten der Melanomzellen aus. Die gesteigerte Verdopplungsrate der Zellen, welche mit siDido #2 behandelt wurden, ist somit möglicherweise auf sogenannte off-target Effekte zurückzuführen. Off-target Effekte der siRNA vermittelten Genregulation wurden erstmals 2003 von Jackson und Kollegen beschrieben; es handelt sich hierbei um Reaktionen, welche durch eine unspezifische Bindung der siRNA an eine weitere mRNA hervorgerufen wird (Jackson et al. 2003). Eine BLAST-Analyse der siDido1 #1 Sequenz ergab, dass diese siRNA ausschließlich die verschiedenen Dido1-Isoformen erkennt, wohingegen die siDido1 #2 mit einer sehr geringen Wahrscheinlichkeit zusätzlich an die Sequenz von ABR (active BCR-related gene) binden kann. Obwohl bisher keine Daten in Bezug auf die Funktion von ABR bekannt sind, ist es dennoch vorstellbar, dass die Bindung der siRNA an ABR Dido1-unspezifische Reaktionen hervorruft.

5.2.4.2 Dido1 fördert das Attachment der Melanomzellen

Für die Progression des Tumors ist aber nicht nur die gesteigerte Proliferation der Zellen, sondern auch das Attachment der Melanomzellen an die extrazelluläre Matrix (ECM) von zentraler Bedeutung. Erst nach der Anhaftung der Zellen kann die ECM mit Hilfe von matrix-degradierenden Enzymen abgebaut werden und die malignen Zellen sind in der Lage, in tiefer liegende Hautschichten einzuwandern. Im Rahmen dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die Inhibition der Expression des BMP-Zielgens Dido1 mit Hilfe verschiedener siRNAs die Fähigkeit der Melanomzellen sich an die Komponenten der Basalmembran anzuheften, stark vermindert war.

Folglich konnte zusammenfassend gezeigt werden, dass Dido1 keinen Einfluss auf das Tumorzellwachstum *in vitro* hat, jedoch das Attachment der Zellen fördert.

5.2.4.3 Induktion der Migration und Invasion durch Dido1

Bisherige Studien unserer Arbeitsgruppe konnten bereits zeigen, dass BMPs eine wichtige Rolle für die Migration von Tumorzellen spielen. So weisen hepatozelluläre Karzinomzellen, welche mit einer siRNA gegen BMP4 oder einem antisense BMP4 Konstrukt behandelt wurden, eine Inhibition des migratorischen und invasiven Verhaltens auf (Maegdefrau et al. 2009). Des Weiteren konnten Wu und Kollegen ebenfalls in Leberkarzinomzellen zeigen, dass die Hemmung des BMP-Signalweges mit Hilfe von einer siRNA gegen BMP2 die Expression von MMP2 und MMP9 reduziert und dadurch die Migration und Invasion von Leberkarzinomzellen vermindert (Wu et al. 2010). Überdies wurde auch in Ovarialkarzinom- und Pankreaskarzinomzellen eine positive Wirkung der BMPs auf das migratorische Potential der Zellen festgestellt (Theriault et al. 2007; Gordon et al. 2009). Darüber hinaus zeigte sich im malignen Melanom, dass vor allem BMP4 die Migrations- und Invasionsfähigkeit der Zellen fördert. So konnte nachgewiesen werden, dass die Behandlung von Melanomzellen mit BMP4 zu einer erhöhten Migrationsfähigkeit führt (Braig et al. 2010). Weiterhin konnte anhand von asBMP4 Klonen, bzw. Zellen, welche den BMP-Inhibitor Chordin überexprimieren, demonstriert werden, dass die Hemmung der BMP-Aktivität das invasive Potential der Melanomzellen stark vermindert (Rothhammer et al. 2005). Da Dido1 ein Zielgen des BMP-Signalweges darstellt, wurde in dieser Arbeit untersucht, ob die BMP-abhängigen Auswirkungen auf die Migrations- und Invasionsfähigkeit der Melanomzellen zumindest teilweise über eine Induktion der Dido1 Expression vermittelt werden. Dazu wurden Mel Im und Mel Ju Zellen mit verschiedenen siRNAs gegen Dido1 transfiziert und in mehreren funktionellen Assays analysiert. Im Wundheilungsassay (auch Scratchassay genannt) zeigte sich, dass Zellen, welche mit Dido1 siRNAs behandelt wurden, ein deutlich geringeres migratorisches Potential aufweisen. Da mit Hilfe des Scratchassays jedoch nur die ungerichtete Wanderung der Zellen detektiert werden kann, wurden zusätzlich Boyden Kammer und xCelligence Untersuchungen durchgeführt, durch welche die Bewegung der Zellen in Richtung eines Chemoattraktans analysiert wird. Diese Experimente zeigten in Analogie zum Scratchassay eine starke Reduktion der Migration der siDido1 transfizierten Zellen.

In weiterführenden Analysen wurde die Invasionsfähigkeit der mit siRNA gegen Dido1 transfizierten Zellen in Boyden Kammer Experimenten untersucht. Dabei konnte ebenfalls eine Abnahme des invasiven Potentials der siDido1 transfizierten Zellen detektiert werden. Um sicherzustellen, dass das Zellkulturmodell auch tatsächlich dem Verhalten der Tumorzellen unter physiologischen Bedingungen entspricht, wurden zur Annäherung an die physiologischen Gegebenheiten des Tumors multizelluläre Sphäroide aus

Melanomzellen, welche mit siRNAs gegen Dido1, bzw. einer Kontroll-siRNA transfiziert wurden, generiert. Sphäroide sind kugelförmige Aggregate, welche aus mehreren Tausend Zellen bestehen. Da sie den dreidimensionalen Kontext der Tumorzellen widerspiegeln, werden sie mittlerweile in vielen Fällen als *in vitro* Modell zur Testung von therapeutischen Ansätzen in der Krebsforschung verwendet (Hirschhaeuser et al. 2010).

Die transfizierten Sphäroide wurden anschließend in Kollagen eingebettet und mit Fibroblasten konditioniertem Medium (FKM) inkubiert. Es zeigte sich, dass die mit siRNA gegen Dido1 transfizierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen nur sehr vereinzelt aus dem Sphäroid in die umgebende Kollagenmatrix auswandern. Diese Experimente beweisen somit eindeutig, dass Dido1 durch die Induktion der Migrations- und Invasionsfähigkeit die Progression des malignen Melanoms fördert.

5.2.4.4 Dido1 stimuliert das matrix-unabhängigen Wachstum der Melanomzellen

Im Gegensatz zu normalen Zellen sind Tumorzellen in der Lage, ohne Bindung an die extrazelluläre Matrix zu wachsen und sich zu teilen. Als Folge davon können die malignen Zellen wandern und sich an anderen Stellen des Körpers ansiedeln. Um zu untersuchen, ob Dido1 eine Auswirkung auf das matrix-unabhängige Wachstum der Melanomzellen ausübt, wurde der Colony Forming Assay durchgeführt. Es zeigte sich, dass durch die Inhibition der Dido1 Expression die Zahl der einzelnen Kolonien nicht verringert wurde. Jedoch konnte festgestellt werden, dass sich signifikant kleinere Kolonien ausbildeten. Dies weist darauf hin, dass Dido1 nicht die Ausbildung, sondern das Wachstum der Kolonien fördert.

Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass die siRNA gegen Dido1 in den Melanomzellen Seneszenz hervorruft, wodurch es zu einem Wachstumsstopp der Zellen kommt. In anschließenden Untersuchungen zeigte sich jedoch, dass die Dido1 abhängige Zunahme des matrix-unabhängigen Wachstums nicht auf einer Induktion der Seneszenz beruht.

5.2.4.5 Dido1 hemmt die Apoptose der Melanomzellen

Aus der Literatur ist bekannt, dass die Isoform a von Dido1 eine wichtige Rolle in der Regulation der Apoptose spielt. So konnten García-Domingo und Kollegen in Vorläuferzellen der Lymphozyten zeigen, dass die Expression von Dido1 nach Induktion der Apoptose sehr schnell hochreguliert wird. Darüber hinaus führte die Überexpression von Dido1 in murinen B-Zellen zu einem massiven Zelltod, welcher durch Inhibition der Caspasen gehemmt werden konnte. Diese Daten weisen darauf hin, dass Dido1 die Apoptose über den caspase-abhängigen Signalweg induziert (García-Domingo et al. 1999). In nachfolgenden Studien an MEFs (mouse embryonic fibroblasts) konnte weiterhin demonstriert werden, dass Dido1 unter normalen Bedingungen im Zytoplasma der

Zellen lokalisiert ist und Homooligomere ausbildet. Nach Induktion der Apoptose transloziert Dido1 in den Zellkern und stimuliert vermutlich über die Aktivierung des Promotors die Expression und die Aktivität der Procaspasen 3 und 9. Dies führt daraufhin zu einer Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien, was wiederum die Apoptosekaskade fördert (Garcia-Domingo et al. 2003). Um nun festzustellen, ob Dido1 im malignen Melanom ebenfalls eine Apoptose-stimulierende Funktion ausübt, wurden Zellen mit siRNAs gegen Dido1 behandelt und mittels FACS Analysen auf apoptotische Eigenschaften untersucht. Im Gegensatz zu den bisher publizierten Daten zeigte sich jedoch hierbei, dass Dido1 die Induktion der Apoptose im Melanom inhibiert. Dadurch können sich die Zellen den regulatorischen Kontrollmechanismen, welche bei Entartung der Zellen den programmierten Zelltod induzieren, entziehen und somit die Entstehung und Progression des Melanoms fördern. Vermutlich wird diese Inhibition der Apoptose über eine Hemmung der Aktivität oder Expression der Effektorcaspasen (Caspase 3,6 und 7) vermittelt. Allerdings ist es auch möglich, dass Dido1 im Caspase-unabhängigen Apoptose-Signalweg eingreift. Die genaue Aufklärung des zugrunde liegenden Mechanismus der anti-apoptotischen Wirkung von Dido1 auf die Melanomzellen wird jedoch Gegenstand künftiger Untersuchungen sein.

Ursprünglich wurden für die funktionellen Analysen stabile antisense Dido1 Melanomzellklone generiert. Diese zeigten eine sehr deutliche Herunterregulation der Dido1 mRNA, welche allerdings im Verlauf der Kultivierung nicht mehr nachzuweisen war. Diese Beobachtungen lassen sich durch die antiapoptotische Wirkung von Dido1 erklären. Die Melanomzellen, welche das asDido1 Konstrukt aufgenommen hatten, waren nicht mehr in der Lage Dido1 zu exprimieren. Es kam daher vermutlich zu einer Induktion der Apoptose und die Zellen starben nach einiger Zeit ab. Dies begünstigte das Wachstum der normalen Zellen, so dass sich die Dido1 Expressionsstärke im Verlauf der Kultivierung den Kontrollwerten annäherte.

Zusammenfassend konnte in diesem Teil der Arbeit gezeigt werden, dass Dido1 ein Smad-abhängiges Zielgen des BMP-Signalwegs darstellt. Die Überexpression von Dido1 im Melanom fördert das Attachment, induziert die Migrations- und Invasionsfähigkeit und stimuliert das matrix-unabhängige Wachstum der Zellen. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass Dido1 eine antiapoptotische Wirkung auf die Melanomzellen ausübt. Diese Daten belegen, dass Dido1 über verschiedene Mechanismen die Entstehung und Progression des malignen Melanoms beeinflusst und somit ein bedeutendes BMP-Zielgen darstellt.

6 Materialien und Methoden

6.1 Materialien

6.1.1 Allgemeine Materialien

Amaxa GmbH, Köln	NHEM-Neo Nucleofector Kit
Ambion, Austin, USA	mirVana™ miRNA Isolation Kit, mirVana™ qRT-PCR miRNA Detection Kit, mirVana™ qRT-PCR Primer Sets, mirVana™ qRT-PCR Primer Sets for Normalization
BD Bioscience, Bedford, USA	Matrigel, Biocoat™ Matrigel Invasion Chamber
BD Discovery Labware Falcon™, Boston, USA	Einmalartikel für Zellkultur, Polystyrene Round-Bottom Tubes
Behrens, Hamburg	Agar
Bio-Rad, München	Immun-Blot™ PVDF Membran, Precision Plus Protein™ Standards Kaleidoscope™
BioWhittaker Molecular Applications, Rockland, USA	SeaKern® LE Agarose
Braun, Frankfurt am Main	Aqua injectabile
Carl Zeiss, München-Hallbergmoos	AxioCam, MR Grab Software
Dako, Hamburg	Envision™ Detection Systems Peroxidase /DAB

GE Healthcare, Buckinghamshire, England	Amersham ECL Plus Western Blotting Detection System, Amersham Hyperfilm™
Invitrogen, Carlsbad, USA	Lipofectamine Plus™ Reagent, SuperScript™ II Reverse Transcriptase Kit, Ready-Load™ 100bp und 1kb DNA Ladder, pcDNA3 Vektor, TOPO® TA Cloning Kit Dual Promoter, ApoDETECT™ ANNEXIN V-FITC Kit, nicht-essentielle Aminosäuren
J.T.Baker, Griesheim	alle nicht aufgeführten Chemikalien in flüssiger Form, Methanol, Ethanol
Merck, Darmstadt	Hemacolor Fixierlösung, Farbreagenz rot/blau
Millipore, Eschborn	Einmal-Sterilfilter
Neuro Probe, Gaithersburg, USA	Polykarbonat-Membranen für Boydenkammer (Porengröße 8µm)
New England Biolabs, Ipswich, USA	Restriktionsendonucleasen, NEBuffer für Restriktionsenzyme, T4 DNA Ligase, Antarktische Phosphatase, NEB 10-beta Competent <i>E.coli</i>
PAA Laboratories Inc, Dartmouth, USA	Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM), Phosphate Buffered Saline (PBS)
PAN™ Biotech GmbH, Aidenbach	Fötales Kälberserum (FKS), Penicillin/Streptomycin
Pierce/Peribo Science, Bonn	BCA Protein Assay Kit
Promega, Heidelberg	Dual-Luciferase® Reporter Assay System

Promega, Heidelberg	pRL-TK Vektor, pGL3-basic und pGL3-control Vektor
PromoCell, Heidelberg	Melanocyte Growth Medium, Melanozyten
Qiagen, Hilden	HiSpeed™ Plasmid MIDI Kit, QIAquick® Gel Extraction Kit, HiPerFect Transfection Reagent, siRNAs
R&D Systems, Minneapolis, USA	Duoset BMP4 ELISA, Quantikine Human FGF basic ELISA
Roche Diagnostics, Mannheim	Taq®-DNA Polymerase, RNase A, LightCycler® Kapillaren, dN6 Primer, LightCycler® 480 SYBR Green I Master, Ethidiumbromid
Roth, Karlsruhe	Roti® Load1 4x denaturierend
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München	alle nicht aufgeführten Chemikalien in Pulverform in p.a. Qualität, Acrylamid 40% Lösung, Bromphenolblau, BSA, Trypsin, TEMED, Ampicillin, DMSO, SDS, DTT, Tween-20, Oligonukleotide
TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japan	SYBR® Premix Ex Taq™ (Perfect Real time)
Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA	Vectashield® Mounting Medium with DAPI
VWR, Darmstadt	Kaiser's Glycerin Gelatine, 96-Well Platten für BCA-Messungen, Lab-Tek™ Chamber Slides
Whatman International Ltd., Maidstone, England	Whatman 3MM Filterpapier, Nucleopore™ Track-Etch Membrane

Zymed Laboratories Inc., San Francisco,
USA

BCIP/NBT Substrate Kit

6.1.2 Geräte

Autoklaven

Tuttnauer/Systec, Wetztenberg

Tischautoklav Modell 2540 EL
Autoklav 2540 EK

Blotapparaturen

Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell

Brutschränke

Heraeus, Hanau

Zellinkubatur CO₂-Auto Zero, Begasungs-
brutschrank BB6220, CO₂-Inkubator
HeraCell 240

Gelelektrophoreseapparaturen

Bio-Rad, München

Wide Mini Sub[®] Cell GT

Heiz- und Kühlblöcke

Eppendorf, Hamburg

Thermomixer 5436, Thermomixer comfort,
Thermomixer compact

Mikroskope

Leica Microsystems CMS
GmbH, Bensheim

DM IL Type 090-135.001

Zeiss, Jena

Axiovert 10, Axiovert 200, Axio Imager
Zeiss Z1 Fluoreszenzmikroskop

Spannungsgeräte

Bio-Rad, München	PowerPac Basic, PowerPac HC
GE Healthcare Life Science, Freiburg	Electrophoresis Power Supply 1001, Electrophoresis Power Supply 301

Sterilwerkbänke

Heraeus, Hanau	LaminAir HB 2448, HeraSafe KS18
----------------	---------------------------------

Thermocycler

MJ Research, Waltham, USA	Peltier Thermal Cycler PTC-200
Roche Diagnostics, Mannheim	LightCycler® II LightCycler® 480

Waagen

Sartorius, Göttingen	R160P, L2200S
----------------------	---------------

Zentrifugen

Eppendorf, Hamburg	MiniSpin Plus, Centrifuge 5810R
Heraeus, Hanau	Biofuge 13, Biofuge 22R, Megafuge 1.0
Kisker, Steinfurt	Tischzentrifuge
Roche Diagnostics, Mannheim	LC Carousel Centrifuge

Sonstige Geräte

Amaxa GmbH, Köln	Nucleofector® I
Bachhofer, Reutlingen	UV-Transilluminator IL 350 K, 245nm
BD Bioscience, San Jose, USA	FACSCalibur
Berthold, München	Lumat LB 9507
Bühler, Edmund, Tübingen	Schüttler SM25
Heidolph, Kelheim	Magnetrührer MR 2000, MR 2002, Vortexer REAX 2000
IKA-Labortechnik, Staufen	Schüttler IKA-Vibrax VXR
MWG Biotech, Ebersberg	ELISA-Reader Emax, Geldokumentationssystem 2001i
Roche Diagnostics, Mannheim	xCelligence RTCA DP Instrument
Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen	Nanodrop® ND-1000-UV/Vis Spektral- photometer
Savant, New York, USA	Speedvac Concentrator SC 110
WTW, Weilheim	pH-Meter pH522

6.1.3 Bakterien

NEB 10-beta Competent *Escherichia coli* (High Efficiency): Stamm K12, DH10 β TM-Derivat

6.1.4 Viren

Der replikationsdefiziente Adenovirus Ad-bFGF (basic fibroblast growth factor, CMV-Promotor) wurde zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Meenhard Herlyn, Philadelphia, USA.

6.1.5 Zelllinien und primäre Zellen

Mel Ei	Humane Melanomzelllinie aus Primärtumor
Mel Ho	Humane Melanomzelllinie aus Primärtumor (DSMZ-Nr. ACC62)
Mel Im	Humane Melanomzelllinie aus Melanommetastase
Mel Ju	Humane Melanomzelllinie aus Melanommetastase
Mel Juso	Humane Melanomzelllinie aus Primärtumor (DSMZ-Nr. ACC74)
Mel Wei	Humane Melanomzelllinie aus Primärtumor
Melanozyten (NHEMs)	Normale humane epidermale Melanozyten
SkMel 3	Humane Melanomzelllinie aus Lymphknotenmetastase (ATCC-Nr. HTB-69)
SkMel 28	Humane Melanomzelllinie aus Primärtumor (ATCC-Nr. HTB-72)

6.1.6 Vektoren

BMP4 Luciferase Konstrukt

Ein 1618bp langes Fragment des murinen BMP4-Promotors wurde vor das Luciferase Gen des pGL3 Vektors kloniert (Rothhammer et al. 2005).

Ets-1 Luciferase Konstrukt

Die Ets-1 cDNA Sequenz mit der Ets-1 Binding Site wurde dreimal über PvuII und HindIII in den PTKFLUC Vektor vor das Luciferase Gen einkloniert. Das Konstrukt wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Soncin, Frankreich zur Verfügung gestellt.

miRNA-196a1/miRNA-196a2 Expressionskonstrukte

Hsa-miR-196a1 und hsa-miR-196a2 Pre-miR Sequenzen wurden in den pCRII-TOPO Vektor kloniert (Primer siehe 6.1.8.1), mit BamHI und XbaI verdaut und in den pcDNA3 Vektor eingebracht.

pCRII-TOPO

Durch die Verwendung des pCRII-TOPO Vektors (Invitrogen, Carlsbad, USA) ist ein direktes Ligieren von PCR Produkt und Vektor ohne zusätzliche Zwischenschritte möglich.

pcDNA3

Der pcDNA3 Vektor (Invitrogen, Carlsbad, USA) enthält einen CMV Promotor und wird zur hohen, konstitutiven Expression der Gene in Säugerzelllinien verwendet.

pRL-TK

Da der pRL-TK Vektor (Promega, Heidelberg) das Renilla Luciferase Gen aus *Renilla reniformis* enthält, dient er als Transfektionskontrolle bei der Durchführung des Luciferase Assays.

pGL3-basic

Der pGL-3 basic Vektor (Promega, Heidelberg) wird zur Analyse von putativen Promotorregionen verwendet, da er hinter einer multiplen Klonierungsstelle eine modifizierte kodierende Region für das Luciferase Gen der Feuerfliege (*Photinus pyralis*) enthält.

pGL3-control

Zusätzlich zu dem Luciferase Gen des pGL3-basic Vektors enthält der pGL3-control Vektor (Promega, Heidelberg) SV40 (Simian vacuolating virus 40) Promotor und Enhancer Sequenzen, welche die Expression des Luciferase Gens verstärken.

HOX-B7 3'UTR Reporterkonstrukt wildtyp/mutiert

Hinter das Luciferase Gen des pGL3-control Vektors wurde ein 570bp langes Fragment der HOX-B7 3'UTR über eine XbaI Schnittstelle kloniert.

Zur Generierung eines mutierten HOX-B7 3'UTR Reporterkonstruktes wurden über SOE-PCR (Primer siehe 6.1.8.1) 10bp der miR-196a Targetsequenz mutiert. Das 560bp große Fragment wurde in den pGL3-control Vektor kloniert (siehe oben).

asDido1 Expressionskonstrukt

Für das asDido1 Expressionskonstrukt wurden 349bp des humanen Dido1 Genes (Isoform c) mittels PCR amplifiziert und über HindIII und EcoRI reverse (Primer siehe 6.1.8.1) in den pcDNA3 Vektor kloniert.

6.1.7 Rekombinate Proteine und AntikörperRekombinante Proteine

BMP4 Hersteller: R&D Systems (Minneapolis, USA)

eingesetzte Konzentration: 100ng/ml

Primäre Antikörper

Antikörper	Hersteller	Anwendung	Verdünnung
bFGF	R&D Systems (Minneapolis, USA)	Behandlung (Inhibitor)	2µg/ml
HOX-B7	Abnova (Taipei City, Taiwan)	Immunfluoreszenz	1:100
Dido1	Santa Cruz (Santa Cruz, USA)	Immunfluoreszenz	1:50
Smad 5	Cell Signaling (Danvers, USA)	Western Blot	1:1000
p-Smad 1/5/8	Cell Signaling (Danvers, USA)	Western Blot	1:1000
Erk	Cell Signaling (Danvers, USA)	Western Blot	1:1000
p-Erk	Cell Signaling (Danvers, USA)	Western Blot	1:1000

Sekundäre Antikörper

Antikörper	Hersteller	Anwendung	Verdünnung
anti-rabbit HRP	Cell Signaling (Danvers, USA)	Western Blot	1: 2000
anti-mouse FITC	Dako (Hamburg)	Immunfluoreszenz	1:40
anti-rabbit FITC	Dako (Hamburg)	Immunfluoreszenz	1:50

Die Abkürzung „FITC“ steht für Fluoresceinisothiocyanat, „HRP“ steht für Horseradish peroxidase.

6.1.8 Oligonukleotide

Alle humanen Primer wurden von der Firma Sigma-Aldrich (München) bzw. Clontech (Mountain View, USA) bezogen. Nach dem Lösen der lyophilisierten Primer mit ddH₂O wurde die Stammlösung von 100µM bei -20°C gelagert. Für die (quantitative Real Time-) PCR Analysen wurden jeweils 20µM des forward und des reverse Primers eingesetzt.

6.1.8.1 Primer für Expressionsanalysen und Klonierungen

Primername	Nukleotidsequenz (forward/reverse)	Annealing-Temperatur (°C)
β-Aktin	5'- CTACGTGGCCCTGGA CTTCGAGC -3' 5'- GATGGAGCCGCCGATCCACACGG -3'	60-68
bFGF	5'- ACGTAGGAGACACAGCGGTTCGAG -3' 5'- AGCCTAGCAACTCTGCTGGTGATGG -3'	67
BMP4	5'- GATTCCCGTCCAAGCTATC -3' 5'- TCCATGATTCTTGACAGCC -3'	68
Dido1 Isoform 1	5'- CCTCGCCGTCACTGTTGT -3' 5'- GGTCCAGGAGGCCAACC -3'	62
Dido1 Isoform 2	5'- TTCCATCCAAACTCTTGCCCTTT -3' 5'- CCTCACCTCCACCCAGAAAG -3'	62
Dido1 Isoform 3	5'- TTCCATCCAAACTCTTGCCCTTT -3' 5'- CCAAGAATTATATTCGGACGTGGTG -3'	58
HOX-B7	5'- CACTACAATCGCTACCTGACG -3' 5'- TCCTCTTCCTCCTCTGCTTC -3'	62
HOX-B8	5'- AGCAGCCGCCGGACGCAGGCG -3' 5'- GCTGGGGAAC TTGTCTTTGTT -3'	60
Id1	5'- TGTTACTCACGCCTCAAGGAG -3' 5'- TTCAGCGACACAAGATGCG -3'	62
Tyrosinase	5'- GGGCCCAAATTGTAGAGAGAAGC -3' 5'- CTGCCAGGAGGAGAAGAAGAAGGATG -3'	60
TRP2	5'- TGGAGTGGTCCCTACATCCTA -3' 5'- TCACTGGTGGTTTCTTCCG -3'	60

Primername	Nukleotidsequenz (forward/reverse)	Annealing-Temperatur (°C)
Dido1 for EcoR1/ rev HindIII	5'- GACGAATTCATGGACGACAAAGGCGACGAC -3' 5'- GACAAGCTTTCTGGTCTCAGAAGCGCT -3'	58
hsa-miR-196a-1	5'- TCTTCCGATGTGTTGTTTAGTAG -3' 5'- GAC ACT TCC CAG ATCTCTTCT -3'	60
hsa-miR-196a-2	5'-TGCTCGCTCAGCTGATCTGT -3' 5'- GCCCTCGACGAAAACCGAC -3'	60
HOX-B7 3'UTR	5'- CAGTCTAGAAGGGCAGAGGAAGAGACATGA -3' 5'- CAGTCTAGAATCCTTTAGATACACACAGAATGT -3'	58
HOX-B7 3'UTR SOE	5'- CAGACTTTCCTATTTTTCAGTGTTG -3' 5'- CAACACTGAAAAATAGGAAAGTCTG -3'	58

6.1.8.2 siRNA und anti-miR Moleküle

Die siRNAs wurden von der Firma Qiagen (Hilden) synthetisiert, die anti-miRs wurden von der Firma Exiqon (Vedbaek, Dänemark) bezogen.

Name	Target-Sequenz
siDido1#1	CCGACTCGGTGTACTGCAGTA
siDido1#2	TAGCGAAGACCAAGGGATAAA
siFGF2#7	nicht verfügbar
siHOX-B7 #1	CAAATCGAATAGGGAAGTAAA
siHOX-B7#4	CTGGACTCTAATTCTGTAATA
hsa-miR-196a miRCURY™ LNA knockdown probe	nicht verfügbar
Scramble-miR control, miRCURY™ knockdown probe	nicht verfügbar

6.1.9 Medien, Antibiotika und Puffer

6.1.9.1 Medien zur Anzucht von E. coli und Säugerzelllinien

Luria Bertani Medium	10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl → in H ₂ O gelöst und autoklaviert Für Agarplatten: Zugabe von 15 g/l Agar Zur Selektion: Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin
Dulbeccos Modified Eagle Medium	DMEM: PAA, Dartmouth, USA Zusätze: 10% FKS 0,1% Penicillin/Streptomycin
NHEM Medium	MGM2 (Melanocyte Growth Medium 2), PromoCell, Heidelberg
Einfriermedium	50 ml DMEM (mit 10% FKS) 30 ml FKS 20 ml DMSO

6.1.9.2 Antibiotika

Ampicillin- Stammlösung (500x)	50 mg/ml in ddH ₂ O (-20°C)
Geneticin-Stammlösung	100 mg/ml in ddH ₂ O (-20°C)

6.1.9.3 Puffer und Lösungen

6.1.9.3.1 Lösungen für die Isolation von Plasmiden (Mini-Präparation)

Lösung I:	50 mM Glukose 25 mM Tris/HCl pH 8,0 10 mM EDTA
-----------	--

Lösung II:	0,2 M NaOH 1 % SDS
Lösung III:	60 ml KOAc (5M) 11,5 ml Eisessig 28,5 ml H ₂ O

6.1.9.3.2 Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese (DNA-Auftrennung)

TAE (50x)	2 M Tris/Acetat 50 mM EDTA
DNA-Agarosegel	1-2% (w/v) Agarose gelöst in 1x TAE
DNA-Gel-Ladepuffer	40% (v/v) Saccharose 0,25% (w/v) Xylencyanol 0,25% (w/v) Bromphenolblau
Ethidiumbromidlösung	0,04% (w/v) in H ₂ O

6.1.9.3.3 Lösung zur Isolation von Gesamtprotein (RIPA-Puffer)

RIPA-Puffer	50 mM Tris-HCl pH 7,5 150 mM NaCl 1% (w/v) Nonidet® P40 0,5% (w/v) Natriumdesoxycholat 0,1% (w/v) SDS Proteaseinhibitoren
-------------	--

6.1.9.3.4 Lösungen und Gele für die SDS-Gelelektrophorese (Proteinauftrennung)

SDS-PAGE-Laufpuffer	25 mM Tris/HCl pH 8,5 200 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS 3,125 ml Acrylamid 40%
---------------------	--

12,5% Trenngel (für 1 Gel)	3,75 ml Tris pH 8,8 (1 M) 2,97 ml H ₂ O 100 µl SDS (40%) 50 µl APS 10 µl TEMED
----------------------------	---

4% Sammelgel (für 1 Gel)	375 µl Acrylamid 40% 450 µl Tris pH 6,8 (1 M) 2,85 ml H ₂ O 37,5 µl SDS (40%) 25 µl APS 3,5 µl TEMED
--------------------------	--

6.1.9.3.5 Lösungen für den Western Blot

Western Blot Transferpuffer	10% (v/v) Methanol 25 mM Tris 190 mM Glycin
-----------------------------	---

PBS (10x)	80 g/l NaCl 2 g/l KCl 14,4 g/l Na ₂ HPO ₄ 2,4 g/l KH ₂ PO ₄ → einstellen auf pH 7,4 → für PBS/T: + 0,2 % (v/v) Tween20
-----------	---

Blockingreagenz	5% Milchpulver/TBS-Tween (0,1%)
-----------------	---------------------------------

6.1.9.3.6 Lösung für die Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase Färbung

Färbelösung	20 mg/ml X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid) in DMSO 0,2 M Zitronensäure/Phosphatpuffer pH = 6,0 100 mM $K_3Fe(CN)_6$ 100mM $K_4Fe(CN)_6$ 5 M NaCl 1 M $MgCl_2$
-------------	--

Fixierlösung	3,7% Formaldehydlösung
--------------	------------------------

6.1.9.3.7 Lösungen für die Generierung von Sphäroiden

Methocel	6 g Methylcellulose → in 250 ml DMEM (60°C) lösen → + 250 ml DMEM (Raumtemperatur) → abkühlen lassen, aliquotieren → bei 4000 rpm und 20 min bei 4°C zentrifugieren
----------	---

6.1.9.3.8 Lösungen für Anchorage- Independent Growth Assay

1x MEM / 2x MEM	0,2501 g DMEM Pulver (0,500 g für 2x MEM) 0,0875 g $NaHCO_3$ (0,175 g für 2x MEM) → in 20 ml ddH ₂ O lösen + 0,25 ml nichtessentielle Aminosäuren (0,5 ml für 2x MEM) → auf 25 ml mit ddH ₂ O auffüllen → pH 7,2, sterilfiltrieren
-----------------	---

2% Agar	0,2 g Agar → in 10 ml H ₂ O aufkochen, anschließend ins Wasserbad (45°C)
---------	--

0,5% Grundagar	5,4 ml 1xMEM 4,5 ml 2x MEM 3,6 ml FKS (auf 45°C erwärmt) 4,5 ml 2% Agar
0,3% Topagar (pro Well)	0,6 ml Grundagar 0,4 ml Zellsuspension in 1x MEM

6.1.9.3.9 Sonstige Lösungen und Puffer

PBS (für die Zellkultur)	PAA, Dartmouth, USA
RNAse A Lösung	10 mM Tris/HCl pH 7,0 10 mg/ml RNAse A

6.2 Methoden

6.2.1 Arbeiten mit *Escherichia coli*

6.2.1.1 Kultivierung von *E. coli*

Escherichia coli Bakterien wurden je nach Verwendungszweck auf festen Nährböden oder in flüssiger Schüttelkultur angezogen. Zur Selektion transformierter Bakterien wurde zusätzlich zum Nährmedium ein Antibiotikum (meist Ampicillin) zugesetzt. Schüttelkulturen wurden durch Picken eines Klonen mit einer sterilen Spitze angeimpft, für die Agarplatten wurden Bakterien mit Hilfe eines sterilen Trigalsky Spatel ausplattiert. Die Inkubation der Schüttelkulturen erfolgte über Nacht bei 37°C im Schüttler bei 250 rpm, die der Agarplatten bei 37°C im Brutschrank.

6.2.1.2 Transformation von *E. coli*

Zur Transformation kompetenter *E. coli* wurde die entsprechende Menge der Plasmid-DNA zu 100 µl kompetenten Zellen gegeben. Es folgte eine 30minütige Inkubation auf Eis. Anschließend wurden die Zellen für 30 Sekunden einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt, um die Plasmidaufnahme ins Zellinnere zu ermöglichen. Nach dem Abkühlen auf Eis für 5 Minuten wurde den Zellen 950 µl LB-Medium zugesetzt und die Kultur eine Stunde bei 37°C geschüttelt. Die Bakterien wurden dann bei 4000 rpm abzentrifugiert, der

Überstand dekantiert und im verbleibenden Medium resuspendiert. Schließlich wurde die Bakteriensuspension auf Agarplatten mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum ausplattiert und 16 Stunden bei 37°C inkubiert.

6.2.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse. Für die Plasmid Minipräparation wurde 5 ml steriles LB Medium mit Selektionsantibiotikum versetzt, mit einer Einzelkolonie angeimpft und für 16 Stunden bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Von 1 ml der Schüttelkolonie wurde ein Bakterienpellet erhalten, welches in 100 µl Lösung I resuspendiert wurde. Zur Lyse der Bakterien wurde nach 5 Minuten Inkubation auf Eis 200 µl Lösung II hinzugegeben und dabei das Gefäß vorsichtig geschwenkt. Dieser Schritt ermöglicht die spätere Abtrennung der Plasmid DNA von Proteinen und chromosomaler DNA. Das in Lösung II enthaltene SDS denaturiert die Proteine, das alkalische Milieu zerstört die chromosomale DNA. Anschließend wurden dem Ansatz 150 µl Lösung III zugegeben und fünf Minuten auf Eis inkubiert. Durch die darauf folgende fünfminütige Zentrifugation bei 13000 rpm wurden denaturierte Proteine, hochmolekulare RNA und chromosomale DNA entfernt. Der Überstand mit der enthaltenen Plasmid DNA wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 900 µl reinem Ethanol gefällt. Dazu wurde der Ansatz 10 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend 10 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bei 37°C getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 10 µl eines H₂O/RNase Mixes (120 µl H₂O + 5 µl RNase) resuspendiert und 20 Minuten bei 37°C geschüttelt, um störende RNA zu entfernen.

Für die Plasmid Midipräparation wurden 50 ml steriles LB Medium mit Selektionsantibiotikum versetzt, mit 50 µl Bakteriensuspension aus einer Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler herangezogen. Die Plasmidisolierung erfolgte mit dem HiSpeed™ Plasmid Midi Kit der Firma Qiagen (Hilden) nach Angaben des Herstellers. Die Plasmid DNA wurde mit 500 µl Tris Puffer (5 mM) eluiert und bei -20°C gelagert.

6.2.2 Molekularbiologische Arbeiten

6.2.2.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Die Spaltung von DNA durch Restriktionsenzyme erfolgte in einem Volumen von 10 µl mit etwa 0,5 µg Plasmid DNA, 5 U des entsprechenden Enzyms und 1 µl des vom Hersteller empfohlenen 10x Reaktionspuffers. Die Ansätze wurden 1-2 Stunden bei optimaler Reaktionstemperatur inkubiert und mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese (siehe

6.2.2.2) aufgetrennt. Für die Klonierungen wurde der jeweilige Vektor in einem 40 µl Ansatz verdaut. Anschließend erfolgte die Aufreinigung des Vektors wie unter 6.2.2.3 beschrieben.

6.2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Je nach Größe der DNA-Moleküle verwendet man unterschiedlich prozentuale Anteile an Agarose im Gel. Für die Trennung kleinerer Fragmente unter 100bp verwendet man hochprozentige Agarosegele (2-3%), um die größeren Fragmente von 500bp bis 12 kb zu unterscheiden werden meist 0,8-1% Agarosegele benutzt. Die Agarose wurde in 1x TAE-Puffer aufgekocht und in den Gelschlitten gegossen. Nach dem Aushärten des Gels wurde die Probe, versetzt mit 1/10 Volumen Probenpuffer, aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 10 Volt pro Zentimeter Gellänge. Zur Visualisierung wurde das Gel anschließend 10 Minuten in einer Ethidiumbromidlösung (0,04%) inkubiert. Die DNA konnte durch Anregung mit UV-Licht bei 245nm detektiert werden, da das interkalierte Ethidiumbromid durch die UV-Absorption im sichtbaren Bereich fluoresziert.

6.2.2.3 Isolierung und Aufreinigung von DNA- Fragmenten

Die Isolation von DNA- Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen (Hilden). Nach elektrophoretischer Auftrennung (siehe 6.2.2.2) wurden die zu untersuchenden Fragmente unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten, abgewogen und nach Angaben des Herstellers isoliert. Die Elution erfolgte mit 50 µl ddH₂O.

6.2.2.4 DNA- Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration gelöster Nukleotide wurde mittels UV-Absorption am Photometer bei einer Wellenlänge von 260nm bestimmt. Für optische Dichten < 1 gilt näherungsweise folgender linearer Zusammenhang: 1 OD_{260nm} Einheit = 50µg/ml dsDNA bzw. 40µg/ml RNA.

6.2.2.5 Klonierung von DNA-Fragmenten in Plasmide

Zur Herstellung von Expressionsplasmiden wurde das DNA Fragment (Insert) mittels PCR aus cDNA amplifiziert (siehe 6.2.2.8). Die hierbei verwendeten Primer enthielten zusätzlich die Sequenz für die verschiedenen Restriktionsschnittstellen. Der Vektor und das Insert wurden mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen geschnitten, elektrophoretisch aufgetrennt und mit Hilfe der Gelextraktion aufgereinigt. Die Ligation

erfolgte bei Raumtemperatur für 2 Stunden mit 2 µl Ligase Puffer (10x), 0,5 µg Vektor, 5fachem Überschuss an Insert, 400U T4 DNA Ligase, add 20 µl ddH₂O. Anschließend wurde der komplette Ligationsansatz in ultrakompetente *E.coli* transformiert. Nach der Plasmid Mini- und Midipräparation (siehe 6.2.1.3) wurde die Klonierung durch Sequenzierung bei der Firma Entelechon (Regensburg) überprüft.

6.2.2.6 RNA- Isolierung aus Säugerzellen

Die Isolation von RNA wurde mit dem E.Z.N.A.[®] Total RNA Kit I der Firma Omega Bio-tek (VWR, Darmstadt) durchgeführt. Dazu wurden konfluent wachsende Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA Lösung (0,05% bzw. 0,02% (w/v)) von der Oberfläche abgelöst und pelletiert. Die RNA-Isolation erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die in 40 µl ddH₂O eluierte RNA wurde bei -20°C gelagert.

Für die Isolierung der miRNA wurde das mirVana[™] miRNA Isolation Kit der Firma Ambion (Austin, USA) nach Angaben des Herstellers verwendet.

6.2.2.7 Reverse Transkription

Für die Transkription von mRNA in cDNA wurden pro Reaktion 500ng RNA eingesetzt. Pro 20 µl Ansatz wurden 4 µl First Strand buffer (5x), 2 µl DTT (0,1M), 1 µl dNTP-Mix (10 mM), 1 µl dN₆-Primer (Random Hexamer Primer, 2mg/ml), x µl RNA-Lösung und eine entsprechende Menge an ddH₂O verwendet. Nach der fünfminütigen Inkubation bei 70°C zur Denaturierung der RNA wurde je Reaktionsgefäß 1 µl Superscript II Reverse Transcriptase zugegeben und das Gemisch eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym für 10 Minuten bei 70°C hitzeinaktiviert und der Ansatz mit 1µl RNase A Lösung 20 Minuten bei 37°C RNase verdaut. Die cDNA wurde bei -20°C eingefroren.

6.2.2.8 Polymerase- Ketten-Reaktion (PCR)

Durch die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) können spezifische DNA Fragmente amplifiziert werden. Die Reaktion wurde in einem Volumen von 50 µl mit folgenden Komponenten durchgeführt: 5 µl PCR-Puffer (10x), 0,5 µl dNTP-Mix (je Nukleotid 10mM), 1 µl forward Primer (20 µM), 1 µl reverse Primer (20 µM), 10 ng Template-DNA (Plasmid-DNA), 0,5 µl Taq-DNA-Polymerase, ad 50 µl ddH₂O. Die Amplifikation im Thermocycler erfolgte abhängig von den verwendeten Primern und der Schmelztemperatur. Das Standardprogramm der PCR lautet folgendermaßen: Denaturierung bei 94°C für 60 Sekunden, Annealing der Primer bei der Primer-spezifischen Temperatur (siehe 6.1.8.1) für 30 Sekunden, Elongation bei 72°C für 45 Sekunden. Es wurden meist 36 Zyklen durchgeführt. Abschließend wurden die Proben auf 4°C abgekühlt und mit Hilfe eines Agarosegels (siehe 6.2.2.2) überprüft.

6.2.2.9 Quantitative Real-time PCR (qRT-PCR)

Die Quantifizierung der mRNA-Expressionsstärke wurde in einer quantitativen RT-PCR mit Hilfe des LightCycler® II Systems, bzw. des LightCycler® 480 Systems von Roche Diagnostics, Mannheim durchgeführt. Die Reverse Transkription erfolgte nach dem oben beschriebenen Prinzip. Durch die Zugabe des fluoreszierenden Farbstoffs SYBR-Green in den PCR-Ansatz ist es möglich, die entstandenen PCR Produkte zu quantifizieren. Die Reaktion erfolgte in einem 20 µl Volumenansatz mit folgenden Komponenten: 10ng cDNA Template, 0,5 µl forward Primer (20 µM), 0,5µl reverse Primer (20 µM), 10 µl TaKaRa SYBR® Premix Ex Taq™ (bei Benutzung des LightCycler® II Systems) bzw. 10 µl Light-Cycler® 480 SYBR Green I Master (bei Verwendung des LightCycler® 480 Systems), ad 20 µl ddH₂O.

Die Reaktion wurde im LightCycler® II bei folgendem Programm durchgeführt:

Denaturierung: 1 Zyklus: 20°C/sec auf 95°C, 30 s ec

Amplifikation: 40 Zyklen: 20°C/sec auf 95°C, 15 sec

20°C/sec auf x°C, 5 sec

20°C/sec auf 72°C, 10 sec

Messtemperatur: 20°C/s auf x°C

Schmelzpunktanalyse: 1 Zyklus: 20°C/sec auf 95°C, 15 sec

20°C/sec auf 65°C, 15 sec

20°C/sec auf 95°C, 15 sec

0,1°C/sec auf 40°C

Die Reaktion erfolgte im LightCycler® 480 bei folgendem Programm:

Denaturierung:	1 Zyklus:	4,4°C/sec auf 95°C, 10 min
Amplifikation:	45 Zyklen:	4,4°C/sec auf 95°C, 10 sec
		2,2°C/sec auf x°C, 10 sec
		4,4°C/sec auf 72°C, 20 sec
	Messtemperatur:	4,4°C/sec auf x°C, 1 sec
Schmelzpunktanalyse:	1 Zyklus:	4,4°C/sec auf 95°C, 5 sec
		2,2°C/sec auf 65°C, 60 sec
		0,11°C/sec auf 97°C
		2,2°C/sec auf 40°C, 30 sec

Die Annealing- und Messtemperaturen sind abhängig vom jeweiligen Primerpaar. Als Standard zur Quantifizierung wurde β -Aktin bzw. 5S rRNA (für miRNA Quantifizierung) benutzt. Die Analyse erfolgte mit der zugehörigen Software nach Angaben des Herstellers.

6.2.2.10 Analyse der BMP regulierten Zielgene mittels Microarray

Um die BMP-regulierten Zielgene in Melanomzellen zu identifizieren, wurde eine Affymetrix GeneChip® Expressionsanalyse mit Hilfe des Human Gene 1.0 ST Array durchgeführt. Dazu wurden die Melanomzelllinien Mel Im und Mel Ju auf T25-Zellkulturgefäßen ausplattiert und mit 2 μ M des BMP-Inhibitors Dorsomorphin, bzw. mit DMSO als Kontrolle behandelt. Nach einer Inkubationszeit von 6 Stunden erfolgte die Isolierung der RNA (siehe 6.2.2.6), welche anschließend vom Kompetenzzentrum Fluoreszenz Bioanalytik (Regensburg) weiter verarbeitet wurde. Die generierte cRNA wurde mit Biotin markiert und auf die fluoreszenz-markierten Oligonukleotidsonden des Microarrays hybridisiert. Die detaillierte Analyse der Array-Daten erfolgte mit Hilfe der Software Programmen ChipInspector und BiblioSphere von Genomatix (München). Der Human Gene 1.0 ST Array von Affymetrix besteht aus 764.885 Sonden aus jeweils 25 Nukleotiden, welche 28.869 Gene abdecken. Je höher die Expression des Genes in der jeweiligen Probe, desto stärker ist das Fluoreszenzsignal der Sonde. Da der Array zur Qualitätskontrolle multiple Sonden pro Gen enthält, wurden die Signalstärken der einzelnen Sonden zusätzlich manuell mit Hilfe der ChipInspector Software abgeglichen. Durch den Vergleich der Signalintensitäten der kontroll-behandelten Melanomzellen mit

den Dorsomorphin-behandelten Zellen konnten so die differentiell regulierten Gene identifiziert werden.

6.2.3 Proteinbiochemische Arbeiten

6.2.3.1 Herstellung von Gesamtproteinlysaten

Zur Herstellung von Gesamtproteinlysaten wurden die Zellen in der Zellkulturflasche mit PBS gewaschen, abtrypsiniert und zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1ml PBS resuspendiert und bei 3000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Die Zellen wurden durch Inkubation mit 100-200 µl RIPA Lysepuffer für 15 Minuten auf dem Schüttler bei 4°C lysiert. Anschließend wurde durch zehnmünütige Zentrifugation bei 13.000 rpm der Zelldebris sowie RNA und DNA von den Proteinen im Überstand abgetrennt. Das Proteinlysate wurde in neue Reaktionsgefäße überführt und bei -20°C gelagert.

6.2.3.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinlysaten

Um die Proteinkonzentration der Zelllysate zu bestimmen, wurde der Pierce BCA Protein Assay Kit der Firma Thermo Scientific (Bonn) verwendet. Dieser Kit beruht auf der Methode von Smith et al. (Smith et al. 1985), bei der Cu^{2+} zu Cu^+ reduziert wird (Biuret Reaktion). Das einwertige Kupfer bildet mit Bicinchonsäure (BCA) einen violetten Farbkomplex, der durch photometrische Messung bei 562 nm quantifiziert werden kann.

Von der Gesamtproteinlösung wird ein Volumen von 5µl zusammen mit 200µl alkalischer BCA- Cu^{2+} Lösung (50 Teile Lösung A und 1 Teil Lösung B) auf eine 96 Well Platte pipettiert und bis zur Färbereaktion bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Die Absorption bei 562nm wurde durch die Messung in einem ELISA-Reader bestimmt. Durch die parallele Quantifizierung von BSA-Standards konnte die in den Proteinextrakten enthaltene Konzentration bestimmt werden.

6.2.3.3 SDS- Polyacrylamid Gelelektrophorese

Proteine können mittels der SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Durch die Anlagerung von SDS an die Proteine werden deren Tertiär- und Sekundärstrukturen zerstört und Ladungsunterschiede neutralisiert, so dass die Proteine negativ geladen sind und elektrophoretisch aufgetrennt werden können. Dazu wurden 40 µg Proteinlysate mit 1x Roti-Load Probenpuffer für 10 min bei 70°C erhitzt und anschließend bei 0,8 mA/cm² auf 10 bis 12,75%igen Poly-acrylamidgelen aufgetrennt.

6.2.3.4 Western Blot

Um die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine mittels spezifischer Antikörper nachweisen zu können, wurden diese auf eine PVDF-Membran geblottet. Dazu wurden die Polyacrylamidgele zunächst 15 Minuten in Blotpuffer äquilibriert. Die PVDF-Membran wurde währenddessen 5 Minuten in Methanol und anschließend weitere 5 Minuten in Blotpuffer inkubiert. Die Proteine wurden mittels Elektrophorese (Bio-Rad, Wide Mini Sub[®] Cell GT, 35 min bei 15V) auf die Membran transferiert.

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran eine Stunde bei Raumtemperatur in 5% Milchpulver/TBS-Tween (0,1%) inkubiert und danach über Nacht bei 4°C mit dem spezifischen Primär-Antikörper in geeigneter Verdünnung in 5% BSA/TBST geschwenkt. Nach dem Waschen (3x5min mit TBST) wurde die Membran für eine Stunde mit dem Sekundär-Antikörper, welcher gegen den konstanten Teil des Primär-Antikörpers gerichtet ist und mit HRP (Horseradish peroxidase) konjugiert ist, inkubiert. Abschließend wurde die Membran 3x10 Minuten mit dem entsprechenden Puffer gewaschen. Die Detektion erfolgte mit Hilfe des ECL Plus Western Blotting Detection Kits (GE-Healthcare, England).

6.2.3.5 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Mit Hilfe des ELISAs können Proteine mittels Antigen-Antikörper-Reaktionen quantitativ nachgewiesen werden. Zur Bestimmung der BMP4 Konzentration in den Zelllysaten wurde der DuoSet BMP4 ELISA von R&D Systems (Minneapolis, USA) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die bFGF Proteinkonzentration in den eingesetzten Proben wurde mit Hilfe des Quantikine Human FGF basic ELISAs ebenfalls nach Angaben des Herstellers R&D Systems ermittelt. Zur Auswertung der ELISAs wurden jeweils die ermittelten Proteinkonzentrationen im Verhältnis zum Gesamtproteingehalt der Zellen berechnet.

6.2.3.6 Immunhistologie

Die immunhistologischen Untersuchungen wurden von Rudolf Jung (Molekulare Pathologie, Universitätsklinikum Regensburg) mit Hilfe des Envision[™] Systems von Dako (Hamburg) etabliert und durchgeführt. Hierfür wurden die Paraffinschnitte der verschiedenen Gewebe im Wärmeschrank bei 72°C für 30 Minuten inkubiert, durch Behandlung mit Xylol entparaffiniert und anschließend in der absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Zur Demaskierung des Antigens wurden die Schnitte im Schnellkochtopf bei 120°C für 5 Minuten mit Tris-EDTA Puffer inkubiert. Anschließend wurde die endogene Peroxidase mit Hilfe von H₂O₂ abgesättigt. Nach dem Waschen erfolgte die 30minütige

Inkubation mit dem spezifischen Dido1 Antikörper (siehe 6.1.7) und die nachfolgende Behandlung mit dem Sekundärantikörper (Labelled Polymer, HRP von DAKO) für ebenfalls 30 Minuten. Durch Inkubation mit DAB+Substrat-Chromogen Lösung für 10 Minuten konnte eine spezifische Färbung des Gewebes detektiert werden. Die Gegenfärbung mit positiv geladenem Hämatoxylin ermöglichte die Visualisierung der negativ geladenen Zellkerne.

6.2.3.7 Immunfluoreszenz

Die Zellen wurden auf sogenannten „Lab Teks“ (Chamber cover slides) ausgesät. Dabei handelt es sich um Objektträger, welche aus 2-8 abnehmbaren Kammern bestehen. Nach der 24 bis 72stündigen Inkubationszeit im Brutschrank wurden die Stege der Lab Teks entfernt und die Objektträger kurz mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Fixierung der Zellen auf den Objektträgern entsprechend den verwendeten Antikörpern entweder mit 4% Paraformaldehyd für 10 Minuten bei Raumtemperatur (HOX-B7 Antikörper), oder mit -20°C kaltem Aceton für 10 Minuten bei -20°C (Dido1 Antikörper). Nach der Fixierung wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und durch eine fünfminütige Inkubation mit 0,1% Triton-X100 permeabilisiert. Es schlossen sich drei weitere Waschschritte mit PBS für jeweils 5 Minuten an. Die Blockierung der unspezifischen Proteine erfolgte eine Stunde in der feuchten Kammer durch Zugabe von 1% BSA/PBS, gefolgt von der Inkubation mit dem primären Antikörper (anti-HOX-B7, Abnova, Taiwan; VD 1:100, anti- Dido, Santa Cruz, USA; VD 1:50) bei 4°C über Nacht. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde mit dem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper (FITC-anti-rabbit 1:40, bzw. FITC-anti-mouse 1:50) für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Erneutes viermaliges Waschen für jeweils 10 Minuten entfernt den überschüssigen Antikörper. Durch Eindeckeln mit VectaShield Slide Mounting Medium, welche eine DAPI-Lösung enthält, konnten die Zellkerne angefärbt werden. Die Analyse der Fluoreszenzfärbung (Wellenlänge des Exzitationsmaximums: 495nm, Emissions-maximum: 528nm) erfolgte am Axio Imager Zeiss Z1 Fluoreszenzmikroskop (Axiovision, Carl Zeiss, Oberkochen).

6.2.3.8 Apoptosemessung am FACS

Um den prozentualen Anteil der apoptotischen Zellen nach Behandlung mit siRNA gegen Dido1 zu bestimmen, wurden diese nach der Transfektion mit der siRNA für 72 Stunden inkubiert, anschließend von der 6-well Kulturplatte abtrypsiniert und in FACS-Röhrchen überführt. Da sich die toten Zellen von der Platte ablösen, wurde zuvor zusätzlich der Überstand der jeweiligen Behandlungen abgenommen und zusammen mit den durch Trypsin abgelösten Zellen abzentrifugiert. Zur Messung der Apoptose wurde das

ApoDETECT™ ANNEXIN V-FITC KIT von Zymed (Invitrogen, Carlsbad, USA) nach Angaben des Herstellers verwendet. Das Zellpellet wurde mit je 500µl kaltem PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Mit einer Pasteurpipette wurde der Überstand vollständig entfernt. Anschließend wurden die Zellen in 190µl binding buffer (1x) resuspendiert und mit 10µl Annexin V-FITC Lösung für 10 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Annexin V ist ein Ca^{2+} -abhängiges Phospholipid-bindendes Protein, welches mit hoher Affinität an das Membranprotein Phosphatidylserin bindet. Phosphatidylserin wird während der frühen Phase der Apoptose von der Membraninnenseite an die Membranaußenseite transloziert. Annexin V dient somit als Indikator für apoptotische Zellen. Nach dem Waschen mit 300µl binding buffer und vollständigem Entfernen des Überstandes wurden die Zellen in 190µl binding buffer resuspendiert und mit 10µl Propidiumiodid (20µg/ml) versetzt. Die durchfluss-zytometrische Analyse der Zellen erfolgte zeitnah am FACSCalibur (BD BioScience, San Jose, USA). Durch die zeitgleiche Färbung mit Annexin V und Propidiumiodid (PI), welches nur von toten Zellen oder im Sterben befindlichen Zellen aufgrund ihrer Membrandysfunktion aufgenommen werden kann und in deren DNA interkaliert, können apoptotische und nekrotische Zellen eindeutig voneinander unterschieden werden. So sind nekrotische Zellen PI-positiv und Annexin V-negativ gefärbt, wohingegen apoptotische Zellen eine PI-negative und Annexin V-positive Färbung aufweisen.

6.2.4 Zellkulturmethoden

6.2.4.1 Kultivierung vom Melanomzelllinien und normalen humanen Melanozyten

Die verwendeten Melanomzellen wurden in DMEM mit 10% FKS und 1% Penicillin/Streptomycin bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert. Zum Passagieren wurden die Zellen nach dem Waschen mit PBS durch Inkubation mit 0,05% Trypsin/0,02% EDTA von der Zellkulturflasche abgelöst, anschließend in DMEM aufgenommen und bei 1200 rpm 4min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in DMEM resuspendiert und 1:5 bis 1:10 verdünnt in neue Zellkulturflasche verteilt. Das Zellkulturmedium wurde jeden zweiten Tag gewechselt.

Die primären Melanozyten wurden in Melanozytenmedium (PromoCell, Heidelberg) kultiviert. Die Passagierung erfolgte analog zu den Melanomzelllinien. Normale humane epidermale Melanozyten (NHEMs) wurden bevorzugt in den frühen Passagen verwendet (Passage 1-6).

6.2.4.2 Transiente und stabile Transfektion von humanen Zellen

Zur Transfektion von Melanomzellen mit siRNAs wurde das HiPerFect Transfektionsreagenz (Qiagen, Hilden) verwendet. Dazu wurden die Zellen in 6-Well Kulturplatten ausgesät (200.000 Zellen/well in 2,3 ml DMEM ohne FKS). Es wurden 1,3 µl siRNA (entspricht 375ng) mit 98,7 µl DMEM ohne FKS und 18 µl HiPerFect Reagenz vermischt, gevortext und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz langsam unter Schwenken auf die frisch ausgesäten Zellen pipettiert. Nach 4 h Inkubationszeit in Brutschrank wurde 10% FKS zugegeben. Am folgenden Tag wurde ein Mediumwechsel vorgenommen. Soweit nicht anders angegeben, wurden die Zellen nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden zur Isolierung von RNA bzw. Gesamtproteinlysaten verwendet oder in funktionelle Assays eingesetzt.

Die Transfektion von Melanomzelllinien mit Plasmiden erfolgte mittels der Lipofektamin Methode mit LipofektaminTM Reagent und LipofektaminPlusTM Reagent (Invitrogen, Carlsbad, USA). Für die transiente Transfektion wurden die Zellen im 6-Well Format ausgebracht (300.000 Zellen/Well in 2 ml DMEM mit FKS). Nach einer Adhäsionszeit von mindestens 4 Stunden wurden die Zellen mit frischem Medium versorgt und das Transfektionsreagenz entsprechend den Herstellerangaben zugegeben. Hierbei wurden 0,5µg bis 1µg Plasmid DNA pro Versuchsansatz eingesetzt. Die Zellen wurden nach 24 bis 48 Stunden geerntet.

Zur Herstellung stabil transfizierter Zelllinien wurde der Vektor mittels der Lipofektamin Methode in die Zellen eingebracht und durch Zugabe des entsprechenden Antibiotikums einem Selektionsdruck ausgesetzt. Das Antibiotikum wurde anhand des Resistenzgens, welches der Vektor trägt, ausgewählt.

Humane Melanozyten wurden mithilfe der Nucleofector[®] Technologie (Amaxa, Köln) transfiziert. Hierbei wurde der NHEM-Neo Nucleofector[®] Kit entsprechend den Herstellerangaben angewandt.

6.2.4.3 Luziferase-Reportergen-Assay

Regulatorische DNA-Sequenzen lassen sich mit Hilfe von sogenannten Reportergen Analysen untersuchen. Um die Aktivität eines Promotors zu analysieren, wird ein DNA-Fragment, welches den Promotorbereich beinhaltet, vor das Luziferase-Gen des Reporterplasmids pGL3-basic kloniert. Die Expression des Reportergens verhält sich im eukaryotischen Testsystem proportional zum Aktivierungspotential des klonierten DNA-Fragments. Durch Zugabe des Substrates Luziferin für das Enzym Luziferase kommt es zur Chemilumineszenz, welche am Photometer gemessen werden kann. Durch Kotransfektion mit dem Kontrollvektor pRL-TK (Promega, Heidelberg), welche das Renilla

Luziferase Gen aus *Renilla reniformis* enthält, kann die unterschiedliche Transfektionseffizienz der einzelnen Ansätze berücksichtigt werden. Zur Durchführung des Luziferase-Reporter-Gen-Assays wurde das Dual-Luciferase® Reporter Assay System von Promega (Heidelberg) verwendet. Dazu wurden die Zellen mittels der Lipofectamin Methode transfiziert (siehe 6.2.4.2). Nach 24 Stunden Inkubationszeit wurde das Medium abgegossen und die Zellkulturschale zweimal mit Leitungswasser gespült. Anschließend wurde pro well 300 µl Lysispuffer (1:5 verdünnt) zugegeben und die Zellen 20 Minuten auf dem Schüttler lysiert. Nach der Lyse wurden je 50 µl eines Versuchsansatzes mit den im Kit bereitgestellten Reagenzien im Luminometer vermessen.

6.2.4.4 Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase Färbung

Um den Anteil der seneszenten Zellen nach verschiedenen Behandlungen zu bestimmen, wurden diese mittels der Methode nach Dimri angefärbt (Dimri et al. 1995). Dazu wurden die Zellen im 6-well Format ausgesät, behandelt und 3 Tage inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 3x kurz mit PBS gewaschen und mit 3,7%iger Formaldehydlösung für 5 Minuten fixiert. Nach erneutem Waschen erfolgte die Färbung mit X-Gal-Reagenz (siehe 6.1.9.3.6) bei 37°C über Nacht. Um überschüssiges Färbereagenz zu entfernen wurden die Zellen schließlich mehrmals mit PBS gewaschen und am Mikroskop ausgezählt. Zur Auswertung wurde die Anzahl der seneszenten Zellen, welche sich durch eine deutliche Blaufärbung des Zytosols auszeichnen, im Verhältnis zu der Gesamtzahl der Zellen bestimmt.

6.2.4.5 Migrations- und Invasions-Assays (Boyden Kammer)

Zur Untersuchung des Migrationspotentials bzw. der Invasivität von Zellen wurde der Matrigel Migrations- und Invasions-Assay (Boyden Kammer) verwendet. Dazu wurden sogenannte Boyden Kammern im unteren Kompartiment mit 210 µl konditioniertem Medium befüllt. Zur Herstellung von konditioniertem Medium wurden konfluente Fibroblasten 24 Stunden in DMEM ohne FKS kultiviert, dieses Medium abgenommen und in die Boyden Kammern eingesetzt. Auf das Medium wurden ein Polykarbonat-Filter (Neuro Probe, Gaithersburg, USA) mit einer Porengröße von 8 µm luftblasenfrei aufgelegt und der Aufsatz der Boydenkammer aufgeschraubt. Für die Migrations-Assays wurden die Filter zuvor mit Gelatine beschichtet. Für die Herstellung der Gelatine-beschichteten Membranen wurden die Filter für 20 Minuten in 0,5% Essigsäure bei 50°C langsam gerührt, abgefiltert und zweimal mit bidestilliertem Wasser gespült. Anschließend wurden die Filter eine Stunde in 5mg/ml Gelatine gekocht, erneut gefiltert und eine Stunde bei 100°C getrocknet.

Für die Invasions-Assays wurden zur Nachahmung der Basalmembran 52 µl Matrigel (1:3 verdünnt) gleichmäßig auf unbeschichtete Polykarbonat-Filter aufgebracht. Während der Trocknungszeit des Matrigels von 30 min bei 37°C wurden die Zellen abtrypsiniert, in DMEM ohne FKS aufgenommen und auf eine Zellzahl von 30.000 Zellen/ml im Migrationssassay, bzw. 200.000 Zellen/ml im Invasions-Assay eingestellt. Von dieser Zellsuspension wurden je 800 µl in das obere Kompartiment der Boydenkammer gegeben und für 4 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abgegossen, der Aufsatz aufgeschraubt und der Filter entnommen. Die Oberseite des Filters wurde an einem Papiertuch abgewischt und der Filter in einen Färberahmen eingelegt. Die Fixierung und Färbung erfolgte mittels einer Hemacolor Schnellfärbereagenz, bestehend aus Fixierlösung, Eosin- und Hämalan-Färbelösung. Nach dem Waschen mit Leitungswasser wurden die Filter mit der Unterseite nach oben auf einen Objektträger gelegt und die Anzahl der gewanderten Zellen im Mikroskop bestimmt.

6.2.4.6 Migrations- und Invasions-Assays (xCelligence System, Roche)

Um die Migrations- und Invasionsfähigkeit der Zellen zu untersuchen, wurde neben den Boydenkammern zusätzlich das Real-time Cell Analyzer System xCelligence (Roche, Penzberg) verwendet. Im Gegensatz zum klassischen Boyden Kammer-Assay, welcher nur eine Endpunktanalyse ermöglicht, zeigt das xCelligence System das Verhalten der Zellen in Echtzeit auf. Die Zellen werden auf sogenannten CIM-Plates ausplattiert und bei 37°C im Analyser beobachtet. Jedes Well der CIM-Plate enthält einen Sensor mit zwei Mikroelektroden, welche den Widerstand zwischen den beiden Elektroden auf dem Boden des Wells messen. Dieser Wert korreliert mit der Anzahl der Zellen und wird in Echtzeit als Änderung des Zellindex auf den angeschlossenen Laptop übertragen. Je mehr Zellen sich auf den Wellboden absetzen, desto höher wird der Widerstand und somit der Zellindex.

In den unteren Teil der CIM-Plate wurde als Chemoattraktans 160µl Fibroblastenkonditioniertes Medium (FKM) gegeben. Nach dem Zusammensetzen mit dem oberen Teil der CIM-Plate wurde zur Messung der Migration 27 µl DMEM ohne FKS auf den Filter, welcher im oberen Teil der Plate enthalten ist, pipettiert. Zur Untersuchung des Invasionsverhaltens wurde der Filter mit 20 µl Matrigel (Verdünnung 1:20 mit DMEM ohne FKS) beschichtet. Während der einstündigen Äqualibrierung der CIM-Plate bei 37°C, wurden die Zellen abtrypsiniert und gezählt. Die Zellzahl wurde für die Migration auf 40.000 Zellen/100 µl DMEM-FKS, bzw. 200.000 Zellen/100 µl DMEM-FKS bei Invasionsassays eingestellt. Nach der Messung des Hintergrundwiderstands der CIM-Plate im Analyser wurden pro Well 100 µl Zellen zugegeben, 30 Minuten bei Raumtemperatur in-

kubiert und anschließend in den Analyser eingesetzt. Die Auswertung erfolgte nach Angaben des Herstellers mittels der integrierten Software.

6.2.4.7 Attachment- und Proliferations-Assay (xCelligence System, Roche)

Durch die Verwendung von sogenannten E-Plates ist es möglich, Attachment- und Proliferationsverhalten von Zellen im xCelligence System von Roche nach dem Prinzip der Widerstandsmessung zu untersuchen. Die E-Plates bestehen aus einer Einheit, welche zu Beginn des Versuches mit 100 µl DMEM mit FKS beschichtet und für 30 Minuten bei Raumtemperatur äquilibriert wurde. 2000 Zellen/100 µl DMEM+ FKS wurden nach der Messung des Hintergrunds zugegeben, 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und in den Analyser eingesetzt. Die Auswertung erfolgte mit der entsprechenden Software.

6.2.4.8 Scratch Assay (xCelligence System, Roche)

Um die Migration der Zellen nach den Zufügen einer mechanischen Verletzung zu untersuchen, wurden diese auf einer E-Plate im xCelligence System am Ende der Wachstumsphase mit Hilfe einer 1000er Pipettenspitze durch einen gleichmäßigen, vertikalen Kratzer in den Zellmonolayer abgeschabt. Um alle abgekratzten Zellen zu entfernen, wurde das Medium abgesaugt und durch neues DMEM mit FKS ersetzt. Die Änderung des Zellindexes über die Zeit wurde durch die Software des RTCA xCelligence Systems aufgezeichnet und anschließend graphisch ausgewertet.

6.2.4.9 Generierung von Sphäroiden nach der Hanging drop Methode

Sphäroide ähneln der *in vivo* Situation des Tumors sehr viel mehr als Monolayer-Kulturen. Sphäroide aus Tumorzellen gleichen im Aufbau kleinen dreidimensionalen Tumoren mit einer äußeren Zone proliferierender Zellen, einer intermediären Zone hypoxischer Zellen und einer zentralen nekrotischen Zone. Um Sphäroide in sogenannten „Hanging drops“ zu generieren, wurden die Zellen abtrysiniert und auf eine Zellzahl von 50.000 Zellen/ml DMEM mit FKS eingestellt. Zu den Zellen wurde vorsichtig 20% Methocel (siehe 6.1.9.3.6) zugegeben. Mit Hilfe einer 12-Kanal-Pipette wurden 25 µl der Zell-Methocel-Mischung (entspricht 1250 Zellen pro Sphäroid) in Tropfenform auf den Deckel einer Petrischale ausgebracht. Die Petrischalen wurden umgedreht in den Brutschrank gestellt, wobei zur Vermeidung des Austrocknens in den Boden der Petrischale 5ml PBS pipettiert wurde. Nach 72 Stunden Inkubationszeit im Brutschrank wurden die Sphäroide mit 5ml Medium vorsichtig von der Petrischale abgespült und in einem Falcontube 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Der Überstand wurde verworfen und die abgesetzten Sphäroide wurden in Kollagen eingebettet (siehe 6.2.4.10).

6.2.4.10 Sphäroid- Fibroblast- Konfrontations- Assay

Da Sphäroide Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte ausbilden, eignen sie sich sehr gut zur Untersuchung der Invasionsfähigkeit von dreidimensionalen Zellkulturen. Dazu wurde pro Ansatz 25 µl MEM (10x), 25 µl 7,5 % Bicarbonat (pH 9-9,5) und 149 µl Rattenschwanz-Collagen (Endkonzentration 2,5 mg/ml) vorsichtig ohne Bildung von Luftblasen gemischt. Anschließend wurde 300 µl Sphäroid-Suspension (beinhaltet etwa 100 Sphäroide, siehe 6.2.4.9) mit abgeschnittener Pipettenspitze zugegeben und in die Mitte einer 6-well-Plate pipettiert. Nach dem Auspolymerisieren wurde der Ansatz mit 2 ml Fibroblasten-konditioniertem Medium (FKM) bedeckt. Die Fähigkeit der Zellen aus dem Sphäroid in die umgebende Kollagenmatix auszuwandern wurde über die Dauer von vier Tagen beobachtet und fotografiert.

6.2.4.11 Anchorage-Independent Growth Assay

Der Anchorage-Independent Growth Assay, auch Colony Forming Assay genannt, dient der Analyse von matrixunabhängigem Wachstumsverhalten der Zellen. Dazu wurden 6-well-Zellkulturplatten mit 2 ml Grundagar (siehe 6.1.9.3.8) ausgegossen. Während des Aushärtens des Agars bei 37°C wurden die Zellen abt rypsiniert und ausgezählt. 4×10^4 Zellen wurden in 0,4 ml 1xMEM-Medium (siehe 6.1.9.3.8) aufgenommen, mit 0,6 ml Grundagar gemischt und sofort auf die ausgehärteten Platten gegossen. Nach 10 Tagen Inkubation bei 37°C wurden die Kolonien am Mikroskop fotografiert und der Durchmesser von 15 repräsentativen Kolonien pro well bestimmt.

6.2.5 Statistik

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe der GraphPad Prism Software (GraphPad software, Inc., San Diego, USA) durchgeführt. Alle Experimente wurden in mindestens zwei unabhängigen Versuchen wiederholt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert bzw. prozentualer Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Signifikanzberechnungen zwischen einzelnen Gruppen wurden mit Hilfe des Student's paired t-test durchgeführt. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ns: nicht signifikant

Eigene Publikationen

Rothhammer T, **Braig S**, Bosserhoff AK (2008).

Bone morphogenetic proteins induce expression of metalloproteinases in melanoma cells and fibroblasts.

Eur J Cancer 44(16): 2526-34.

Maegdefrau, U., Amann T, Winklmeier A, **Braig S**, Schubert T, Weiss TS, Schardt K, Warnecke C, Hellerbrand C, Bosserhoff AK (2009).

Bone morphogenetic protein 4 is induced in hepatocellular carcinoma by hypoxia and promotes tumour progression.

J Pathol 218(4): 520-9.

Braig S, Mueller DW, Rothhammer T, Bosserhoff AK (2010)

MicroRNA miR-196a is a central regulator of HOX-B7 and BMP4 expression in malignant melanoma.

Cell Mol Life Sci 67(20): 3535-48.

Literaturverzeichnis

- Abate-Shen, C. (2002). "Deregulated homeobox gene expression in cancer: cause or consequence?" *Nat Rev Cancer* 2(10): 777-85.
- Aguzzi, M. S., D. Faraone, D. D'Arcangelo, F. De Marchis, G. Toietta, D. Ribatti, A. Parazzoli, P. Colombo, M. C. Capogrossi and A. Facchiano (2010). "The FGF-2-Derived Peptide FREG Inhibits Melanoma Growth In Vitro and In Vivo." *Mol Ther.* Oct. 5
- Airola, K., T. Karonen, M. Vaalamo, K. Lehti, J. Lohi, A. L. Kariniemi, J. Keski-Oja and U. K. Saarialho-Kere (1999). "Expression of collagenases-1 and -3 and their inhibitors TIMP-1 and -3 correlates with the level of invasion in malignant melanomas." *Br J Cancer* 80(5-6): 733-43.
- Alsina, J., D. H. Gorsk, F. J. Germino, W. Shih, S. E. Lu, Z. G. Zhang, J. M. Yang, W. N. Hait and J. S. Goydos (2003). "Detection of mutations in the mitogen-activated protein kinase pathway in human melanoma." *Clin Cancer Res* 9(17): 6419-25.
- Ambros, V. (2004). "The functions of animal microRNAs." *Nature* 431(7006): 350-5.
- Amiri, K. I. and A. Richmond (2005). "Role of nuclear factor-kappa B in melanoma." *Cancer Metastasis Rev* 24(2): 301-13.
- Anderson, G. J. and D. Darshan (2008). "Small-molecule dissection of BMP signaling." *Nat Chem Biol* 4(1): 15-6.
- Anna, B., Z. Blazej, G. Jacqueline, C. J. Andrew, R. Jeffrey and S. Andrzej (2007). "Mechanism of UV-related carcinogenesis and its contribution to nevi/melanoma." *Expert Rev Dermatol* 2(4): 451-469.
- Arndt, S., I. Poser, M. Moser and A. K. Bosserhoff (2007). "Fussel-15, a novel Ski/Sno homolog protein, antagonizes BMP signaling." *Mol Cell Neurosci* 34(4): 603-11.
- Babitt, J. L., Y. Zhang, T. A. Samad, Y. Xia, J. Tang, J. A. Campagna, A. L. Schneyer, C. J. Woolf and H. Y. Lin (2005). "Repulsive guidance molecule (RGMa), a DRAGON homologue, is a bone morphogenetic protein co-receptor." *J Biol Chem* 280(33): 29820-7.
- Bailey, J. M., P. K. Singh and M. A. Hollingsworth (2007). "Cancer metastasis facilitated by developmental pathways: Sonic hedgehog, Notch, and bone morphogenic proteins." *J Cell Biochem* 102(4): 829-39.
- Baramova, E. N., K. Bajou, A. Remacle, C. L'Hoir, H. W. Krell, U. H. Weidle, A. Noel and J. M. Foidart (1997). "Involvement of PA/plasmin system in the processing of pro-MMP-9 and in the second step of pro-MMP-2 activation." *FEBS Lett* 405(2): 157-62.
- Barbara, N. P., J. L. Wrana and M. Letarte (1999). "Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily." *J Biol Chem* 274(2): 584-94.
- Bar-Eli, M. (2001). "Gene regulation in melanoma progression by the AP-2 transcription factor." *Pigment Cell Res* 14(2): 78-85.
- Bartel, D. P. (2009). "MicroRNAs: target recognition and regulatory functions." *Cell* 136(2): 215-33.
- Bemis, L. T., R. Chen, C. M. Amato, E. H. Classen, S. E. Robinson, D. G. Coffey, P. F. Erickson, Y. G. Shellman and W. A. Robinson (2008). "MicroRNA-137 targets

- microphthalmia-associated transcription factor in melanoma cell lines." *Cancer Res* 68(5): 1362-8.
- Benezra, R., S. Rafii and D. Lyden (2001). "The Id proteins and angiogenesis." *Oncogene* 20(58): 8334-41.
- Berdowska, I. (2004). "Cysteine proteases as disease markers." *Clin Chim Acta* 342(1-2): 41-69.
- Berking, C., R. Takemoto, H. Schaidler, L. Showe, K. Satyamoorthy, P. Robbins and M. Herlyn (2001). "Transforming growth factor-beta1 increases survival of human melanoma through stroma remodeling." *Cancer Res* 61(22): 8306-16.
- Bikfalvi, A., S. Klein, G. Pintucci and D. B. Rifkin (1997). "Biological roles of fibroblast growth factor-2." *Endocr Rev* 18(1): 26-45.
- Bodey, B., B. Bodey, Jr., S. E. Siegel and H. E. Kaiser (2001). "Matrix metalloproteinase expression in malignant melanomas: tumor-extracellular matrix interactions in invasion and metastasis." *In Vivo* 15(1): 57-64.
- Boergermann, J. H., J. Kopf, P. B. Yu and P. Knaus (2010). "Dorsomorphin and LDN-193189 inhibit BMP-mediated Smad, p38 and Akt signalling in C2C12 cells." *Int J Biochem Cell Biol* 42(11): 1802-7.
- Bokobza, S. M., L. Ye, H. G. Kynaston and W. G. Jiang (2010). "GDF-9 promotes the growth of prostate cancer cells by protecting them from apoptosis." *J Cell Physiol* 225(2): 529-36.
- Braig, S., D. W. Mueller, T. Rothhammer and A. K. Bosserhoff (2010). "MicroRNA miR-196a is a central regulator of HOX-B7 and BMP4 expression in malignant melanoma." *Cell Mol Life Sci* 67(20): 3535-48.
- Breslow, A. (1970). "Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma." *Ann Surg* 172(5): 902-8.
- Care, A., F. Felicetti, E. Meccia, L. Bottero, M. Parenza, A. Stoppacciaro, C. Peschle and M. P. Colombo (2001). "HOXB7: a key factor for tumor-associated angiogenic switch." *Cancer Res* 61(17): 6532-9.
- Care, A., A. Silvani, E. Meccia, G. Mattia, C. Peschle and M. P. Colombo (1998). "Transduction of the SkBr3 breast carcinoma cell line with the HOXB7 gene induces bFGF expression, increases cell proliferation and reduces growth factor dependence." *Oncogene* 16(25): 3285-9.
- Care, A., A. Silvani, E. Meccia, G. Mattia, A. Stoppacciaro, G. Parmiani, C. Peschle and M. P. Colombo (1996). "HOXB7 constitutively activates basic fibroblast growth factor in melanomas." *Mol Cell Biol* 16(9): 4842-51.
- Cavallaro, U. and G. Christofori (2000). "Molecular mechanisms of tumor angiogenesis and tumor progression." *J Neurooncol* 50(1-2): 63-70.
- Chakraborti, S., M. Mandal, S. Das, A. Mandal and T. Chakraborti (2003). "Regulation of matrix metalloproteinases: an overview." *Mol Cell Biochem* 253(1-2): 269-85.
- Chang, T. C., D. Yu, Y. S. Lee, E. A. Wentzel, D. E. Arking, K. M. West, C. V. Dang, A. Thomas-Tikhonenko and J. T. Mendell (2008). "Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis." *Nat Genet* 40(1): 43-50.
- Chopra, V. S. and R. K. Mishra (2006). "'Mir'acles in hox gene regulation." *Bioessays* 28(5): 445-8.
- Cillo, C., M. Cantile, A. Faiella and E. Boncinelli (2001). "Homeobox genes in normal and malignant cells." *J Cell Physiol* 188(2): 161-9.

- Clark, W. H. (1991). "Tumour progression and the nature of cancer." *Br J Cancer* 64(4): 631-44.
- Clark, W. H., Jr., D. E. Elder, D. t. Guerry, M. N. Epstein, M. H. Greene and M. Van Horn (1984). "A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma." *Hum Pathol* 15(12): 1147-65.
- Clark, W. H., Jr., L. From, E. A. Bernardino and M. C. Mihm (1969). "The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin." *Cancer Res* 29(3): 705-27.
- Corte, M. D., L. O. Gonzalez, M. G. Corte, I. Quintela, I. Pidal, M. Bongera and F. Vizoso (2005). "Collagenase-3 (MMP-13) expression in cutaneous malignant melanoma." *Int J Biol Markers* 20(4): 242-8.
- Croce, C. M. (2009). "Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer." *Nat Rev Genet* 10(10): 704-14.
- Davies, H., G. R. Bignell, C. Cox, P. Stephens, S. Edkins, S. Clegg, J. Teague, H. Woffendin, M. J. Garnett, W. Bottomley, N. Davis, E. Dicks, R. Ewing, Y. Floyd, K. Gray, S. Hall, R. Hawes, J. Hughes, V. Kosmidou, A. Menzies, C. Mould, A. Parker, C. Stevens, S. Watt, S. Hooper, R. Wilson, H. Jayatilake, B. A. Gusterson, C. Cooper, J. Shipley, D. Hargrave, K. Pritchard-Jones, N. Maitland, G. Chenevix-Trench, G. J. Riggins, D. D. Bigner, G. Palmieri, A. Cossu, A. Flanagan, A. Nicholson, J. W. Ho, S. Y. Leung, S. T. Yuen, B. L. Weber, H. F. Seigler, T. L. Darrow, H. Paterson, R. Marais, C. J. Marshall, R. Wooster, M. R. Stratton and P. A. Futreal (2002). "Mutations of the BRAF gene in human cancer." *Nature* 417(6892): 949-54.
- De Martino, I., R. Visone, M. Fedele, F. Petrocca, D. Palmieri, J. Martinez Hoyos, F. Forzati, C. M. Croce and A. Fusco (2009). "Regulation of microRNA expression by HMGA1 proteins." *Oncogene* 28(11): 1432-42.
- De Souza Setubal Destro, M. F., C. C. Bitu, K. G. Zecchin, E. Graner, M. A. Lopes, L. P. Kowalski and R. D. Coletta (2010). "Overexpression of HOXB7 homeobox gene in oral cancer induces cellular proliferation and is associated with poor prognosis." *Int J Oncol* 36(1): 141-9.
- Dean, D. B., J. T. Watson, B. R. Moed and Z. Zhang (2009). "Role of bone morphogenetic proteins and their antagonists in healing of bone fracture." *Front Biosci* 14: 2878-88.
- Debernardi, S., S. Skoulakis, G. Molloy, T. Chaplin, A. Dixon-Mclver and B. D. Young (2007). "MicroRNA miR-181a correlates with morphological sub-class of acute myeloid leukaemia and the expression of its target genes in global genome-wide analysis." *Leukemia* 21(5): 912-6.
- Deng, H., R. Makizumi, T. S. Ravikumar, H. Dong, W. Yang and W. L. Yang (2007). "Bone morphogenetic protein-4 is overexpressed in colonic adenocarcinomas and promotes migration and invasion of HCT116 cells." *Exp Cell Res* 313(5): 1033-44.
- Deng, H., T. S. Ravikumar and W. L. Yang (2009). "Overexpression of bone morphogenetic protein 4 enhances the invasiveness of Smad4-deficient human colorectal cancer cells." *Cancer Lett* 281(2): 220-31.
- Deryugina, E. I., L. Soroceanu and A. Y. Strongin (2002). "Up-regulation of vascular endothelial growth factor by membrane-type 1 matrix metalloproteinase stimulates human glioma xenograft growth and angiogenesis." *Cancer Res* 62(2): 580-8.
- Dimri, G. P., X. Lee, G. Basile, M. Acosta, G. Scott, C. Roskelley, E. E. Medrano, M. Linskens, I. Rubelj, O. Pereira-Smith and et al. (1995). "A biomarker that identifies

- senescent human cells in culture and in aging skin in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(20): 9363-7.
- Dotto, G. P., G. Moellmann, S. Ghosh, M. Edwards and R. Halaban (1989). "Transformation of murine melanocytes by basic fibroblast growth factor cDNA and oncogenes and selective suppression of the transformed phenotype in a reconstituted cutaneous environment." *J Cell Biol* 109(6 Pt 1): 3115-28.
- Eckes, B., D. Kessler, M. Aumailley and T. Krieg (1999). "Interactions of fibroblasts with the extracellular matrix: implications for the understanding of fibrosis." *Springer Semin Immunopathol* 21(4): 415-29.
- Fecher, L. A., S. D. Cummings, M. J. Keefe and R. M. Alani (2007). "Toward a molecular classification of melanoma." *J Clin Oncol* 25(12): 1606-20.
- Freeman, S. E., H. Hacham, R. W. Gange, D. J. Maytum, J. C. Sutherland and B. M. Sutherland (1989). "Wavelength dependence of pyrimidine dimer formation in DNA of human skin irradiated in situ with ultraviolet light." *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(14): 5605-9.
- Fremin, C. and S. Meloche (2010). "From basic research to clinical development of MEK1/2 inhibitors for cancer therapy." *J Hematol Oncol* 3: 8.
- Frohling, S., C. Scholl, D. Bansal and B. J. Huntly (2007). "HOX gene regulation in acute myeloid leukemia: CDX marks the spot?" *Cell Cycle* 6(18): 2241-5.
- Futterer, A., M. R. Campanero, E. Leonardo, L. M. Criado, J. M. Flores, J. M. Hernandez, J. F. San Miguel and A. C. Martinez (2005). "Dido gene expression alterations are implicated in the induction of hematological myeloid neoplasms." *J Clin Invest* 115(9): 2351-62.
- Garcia-Domingo, D., E. Leonardo, A. Grandien, P. Martinez, J. P. Albar, J. C. Izpisua-Belmonte and A. C. Martinez (1999). "DIO-1 is a gene involved in onset of apoptosis in vitro, whose misexpression disrupts limb development." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(14): 7992-7.
- Garcia-Domingo, D., D. Ramirez, G. Gonzalez de Buitrago and A. C. Martinez (2003). "Death inducer-obliterator 1 triggers apoptosis after nuclear translocation and caspase upregulation." *Mol Cell Biol* 23(9): 3216-25.
- Garzon, R., M. Garofalo, M. P. Martelli, R. Briesewitz, L. Wang, C. Fernandez-Cymering, S. Volinia, C. G. Liu, S. Schnittger, T. Haferlach, A. Liso, D. Diverio, M. Mancini, G. Meloni, R. Foa, M. F. Martelli, C. Mecucci, C. M. Croce and B. Falini (2008). "Distinctive microRNA signature of acute myeloid leukemia bearing cytoplasmic mutated nucleophosmin." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(10): 3945-50.
- Garzon, R., G. Marcucci and C. M. Croce (2010). "Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges." *Nat Rev Drug Discov* 9(10): 775-89.
- Gazzerro, E. and E. Canalis (2006). "Bone morphogenetic proteins and their antagonists." *Rev Endocr Metab Disord* 7(1-2): 51-65.
- Gehring, W. J. and Y. Hiromi (1986). "Homeotic genes and the homeobox." *Annu Rev Genet* 20: 147-73.
- Golub, T. R., D. K. Slonim, P. Tamayo, C. Huard, M. Gaasenbeek, J. P. Mesirov, H. Coller, M. L. Loh, J. R. Downing, M. A. Caligiuri, C. D. Bloomfield and E. S. Lander (1999). "Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring." *Science* 286(5439): 531-7.
- Gordon, K. J., K. C. Kirkbride, T. How and G. C. Blobe (2009). "Bone morphogenetic proteins induce pancreatic cancer cell invasiveness through a Smad1-dependent

- mechanism that involves matrix metalloproteinase-2." *Carcinogenesis* 30(2): 238-48.
- Griffiths-Jones, S. (2006). "miRBase: the microRNA sequence database." *Methods Mol Biol* 342: 129-38.
- Haflidadottir, B. S., K. Bergsteinsdottir, C. Praetorius and E. Steingrimsdottir (2010). "miR-148 regulates Mitf in melanoma cells." *PLoS One* 5(7): e11574.
- Han, L., P. D. Witmer, E. Casey, D. Valle and S. Sukumar (2007). "DNA methylation regulates MicroRNA expression." *Cancer Biol Ther* 6(8): 1284-8.
- Hao, J., J. N. Ho, J. A. Lewis, K. A. Karim, R. N. Daniels, P. R. Gentry, C. R. Hopkins, C. W. Lindsley and C. C. Hong (2010). "In vivo structure-activity relationship study of dorsomorphin analogues identifies selective VEGF and BMP inhibitors." *ACS Chem Biol* 5(2): 245-53.
- Hardwick, J. C., L. L. Kodach, G. J. Offerhaus and G. R. van den Brink (2008). "Bone morphogenetic protein signalling in colorectal cancer." *Nat Rev Cancer* 8(10): 806-12.
- Hendrix, M. J., E. A. Seftor, D. A. Kirschmann, V. Quaranta and R. E. Seftor (2003). "Remodeling of the microenvironment by aggressive melanoma tumor cells." *Ann N Y Acad Sci* 995: 151-61.
- Hirschhaeuser, F., H. Menne, C. Dittfeld, J. West, W. Mueller-Klieser and L. A. Kunz-Schughart (2010). "Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again." *J Biotechnol* 148(1): 3-15.
- Hofmann, U. B., J. C. Becker and E. B. Brocker (2002). "[Role of matrix-degrading enzymes in melanoma progression]." *Hautarzt* 53(9): 587-95.
- Hogan, B. L. (1996). "Bone morphogenetic proteins in development." *Curr Opin Genet Dev* 6(4): 432-8.
- Hollnagel, A., V. Oehlmann, J. Heymer, U. Ruther and A. Nordheim (1999). "Id genes are direct targets of bone morphogenetic protein induction in embryonic stem cells." *J Biol Chem* 274(28): 19838-45.
- Hotary, K., E. Allen, A. Punturieri, I. Yana and S. J. Weiss (2000). "Regulation of cell invasion and morphogenesis in a three-dimensional type I collagen matrix by membrane-type matrix metalloproteinases 1, 2, and 3." *J Cell Biol* 149(6): 1309-23.
- Hsu, M. Y., F. Meier and M. Herlyn (2002). "Melanoma development and progression: a conspiracy between tumor and host." *Differentiation* 70(9-10): 522-36.
- Huang, S., D. Jean, M. Luca, M. A. Tainsky and M. Bar-Eli (1998). "Loss of AP-2 results in downregulation of c-KIT and enhancement of melanoma tumorigenicity and metastasis." *Embo J* 17(15): 4358-69.
- Iwasaka, C., K. Tanaka, M. Abe and Y. Sato (1996). "Ets-1 regulates angiogenesis by inducing the expression of urokinase-type plasminogen activator and matrix metalloproteinase-1 and the migration of vascular endothelial cells." *J Cell Physiol* 169(3): 522-31.
- Jackson, A. L., S. R. Bartz, J. Schelter, S. V. Kobayashi, J. Burchard, M. Mao, B. Li, G. Cavet and P. S. Linsley (2003). "Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi." *Nat Biotechnol* 21(6): 635-7.
- Javelaud, D., V. I. Alexaki and A. Mauviel (2008). "Transforming growth factor-beta in cutaneous melanoma." *Pigment Cell Melanoma Res* 21(2): 123-32.

- Javelaud, D., V. Delmas, M. Moller, P. Sextius, J. Andre, S. Menashi, L. Larue and A. Mauviel (2005). "Stable overexpression of Smad7 in human melanoma cells inhibits their tumorigenicity in vitro and in vivo." *Oncogene* 24(51): 7624-9.
- Jean, D., J. E. Gershenwald, S. Huang, M. Luca, M. J. Hudson, M. A. Tainsky and M. Bar-Eli (1998). "Loss of AP-2 results in up-regulation of MCAM/MUC18 and an increase in tumor growth and metastasis of human melanoma cells." *J Biol Chem* 273(26): 16501-8.
- Johnson, G. L. and R. Lapadat (2002). "Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases." *Science* 298(5600): 1911-2.
- Katagiri, T., M. Imada, T. Yanai, T. Suda, N. Takahashi and R. Kamijo (2002). "Identification of a BMP-responsive element in Id1, the gene for inhibition of myogenesis." *Genes Cells* 7(9): 949-60.
- Katoh, M. (2007). "Networking of WNT, FGF, Notch, BMP, and Hedgehog signaling pathways during carcinogenesis." *Stem Cell Rev* 3(1): 30-8.
- King, G. N. and F. J. Hughes (2001). "Bone morphogenetic protein-2 stimulates cell recruitment and cementogenesis during early wound healing." *J Clin Periodontol* 28(5): 465-75.
- Kirkbride, K. C., T. A. Townsend, M. W. Bruinsma, J. V. Barnett and G. C. Blobe (2008). "Bone morphogenetic proteins signal through the transforming growth factor-beta type III receptor." *J Biol Chem* 283(12): 7628-37.
- Korchynskyi, O. and P. ten Dijke (2002). "Identification and functional characterization of distinct critically important bone morphogenetic protein-specific response elements in the Id1 promoter." *J Biol Chem* 277(7): 4883-91.
- Krek, A., D. Grun, M. N. Poy, R. Wolf, L. Rosenberg, E. J. Epstein, P. MacMenamin, I. da Piedade, K. C. Gunsalus, M. Stoffel and N. Rajewsky (2005). "Combinatorial microRNA target predictions." *Nat Genet* 37(5): 495-500.
- Krol, J., I. Loedige and W. Filipowicz (2010). "The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay." *Nat Rev Genet* 11(9): 597-610.
- Krumlauf, R. (1994). "Hox genes in vertebrate development." *Cell* 78(2): 191-201.
- Kuphal, S. and A. K. Bosserhoff (2006). "Influence of the cytoplasmic domain of E-cadherin on endogenous N-cadherin expression in malignant melanoma." *Oncogene* 25(2): 248-59.
- Kurschat, P. and C. Mauch (2000). "Mechanisms of metastasis." *Clin Exp Dermatol* 25(6): 482-9.
- Lagos-Quintana, M., R. Rauhut, J. Meyer, A. Borkhardt and T. Tuschl (2003). "New microRNAs from mouse and human." *Rna* 9(2): 175-9.
- Lah, T. T. and J. Kos (1998). "Cysteine proteinases in cancer progression and their clinical relevance for prognosis." *Biol Chem* 379(2): 125-30.
- Lai, C. F. and S. L. Cheng (2002). "Signal transductions induced by bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor-beta in normal human osteoblastic cells." *J Biol Chem* 277(18): 15514-22.
- Langenfeld, E. M., S. E. Calvano, F. Abou-Nukta, S. F. Lowry, P. Amenta and J. Langenfeld (2003). "The mature bone morphogenetic protein-2 is aberrantly expressed in non-small cell lung carcinomas and stimulates tumor growth of A549 cells." *Carcinogenesis* 24(9): 1445-54.
- Langenfeld, E. M. and J. Langenfeld (2004). "Bone morphogenetic protein-2 stimulates angiogenesis in developing tumors." *Mol Cancer Res* 2(3): 141-9.

- Lazar-Molnar, E., H. Hegyesi, S. Toth and A. Falus (2000). "Autocrine and paracrine regulation by cytokines and growth factors in melanoma." *Cytokine* 12(6): 547-54.
- Lekmine, F., C. K. Chang, N. Sethakorn, T. K. Das Gupta and G. I. Salti (2007). "Role of microphthalmia transcription factor (Mitf) in melanoma differentiation." *Biochem Biophys Res Commun* 354(3): 830-5.
- Levy, C., M. Khaled and D. E. Fisher (2006). "MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene." *Trends Mol Med* 12(9): 406-14.
- Lewis, B. P., I. H. Shih, M. W. Jones-Rhoades, D. P. Bartel and C. B. Burge (2003). "Prediction of mammalian microRNA targets." *Cell* 115(7): 787-98.
- Li, D., H. Wang, J. J. Xiang, N. Deng, P. P. Wang, Y. L. Kang, J. Tao and M. Xu (2010). "Monoclonal antibodies targeting basic fibroblast growth factor inhibit the growth of B16 melanoma in vivo and in vitro." *Oncol Rep* 24(2): 457-63.
- Li, R., H. Pei and D. K. Watson (2000). "Regulation of Ets function by protein - protein interactions." *Oncogene* 19(55): 6514-23.
- Lin, P., J. A. Buxton, A. Acheson, C. Radziejewski, P. C. Maisonpierre, G. D. Yancopoulos, K. M. Channon, L. P. Hale, M. W. Dewhirst, S. E. George and K. G. Peters (1998). "Antiangiogenic gene therapy targeting the endothelium-specific receptor tyrosine kinase Tie2." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(15): 8829-34.
- Loffek, S., P. Zigrino, P. Angel, B. Anwald, T. Krieg and C. Mauch (2005). "High invasive melanoma cells induce matrix metalloproteinase-1 synthesis in fibroblasts by interleukin-1alpha and basic fibroblast growth factor-mediated mechanisms." *J Invest Dermatol* 124(3): 638-43.
- Lopez-Rovira, T., E. Chalaux, J. Massague, J. L. Rosa and F. Ventura (2002). "Direct binding of Smad1 and Smad4 to two distinct motifs mediates bone morphogenetic protein-specific transcriptional activation of Id1 gene." *J Biol Chem* 277(5): 3176-85.
- Luthra, R., R. R. Singh, M. G. Luthra, Y. X. Li, C. Hannah, A. M. Romans, B. A. Barkoh, S. S. Chen, J. Ensor, D. M. Maru, R. R. Broaddus, A. Rashid and C. T. Albarracin (2008). "MicroRNA-196a targets annexin A1: a microRNA-mediated mechanism of annexin A1 downregulation in cancers." *Oncogene* 27(52): 6667-78.
- Ma, L., J. Teruya-Feldstein and R. A. Weinberg (2007). "Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer." *Nature* 449(7163): 682-8.
- MacKie, R. M., A. Hauschild and A. M. Eggermont (2009). "Epidemiology of invasive cutaneous melanoma." *Ann Oncol* 20 Suppl 6: vi1-7.
- Maeda, K., J. Hamada, Y. Takahashi, M. Tada, Y. Yamamoto, T. Sugihara and T. Moriuchi (2005). "Altered expressions of HOX genes in human cutaneous malignant melanoma." *Int J Cancer* 114(3): 436-41.
- Maegdefrau, U., T. Amann, A. Winklmeier, S. Braig, T. Schubert, T. S. Weiss, K. Schardt, C. Warnecke, C. Hellerbrand and A. K. Bosserhoff (2009). "Bone morphogenetic protein 4 is induced in hepatocellular carcinoma by hypoxia and promotes tumour progression." *J Pathol* 218(4): 520-9.
- Magli, M. C., P. Barba, A. Celetti, G. De Vita, C. Cillo and E. Boncinelli (1991). "Coordinate regulation of HOX genes in human hematopoietic cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(14): 6348-52.
- Mansfield, J. H., B. D. Harfe, R. Nissen, J. Obenauer, J. Srineel, A. Chaudhuri, R. Farzan-Kashani, M. Zuker, A. E. Pasquinelli, G. Ruvkun, P. A. Sharp, C. J. Tabin and M. T. McManus (2004). "MicroRNA-responsive 'sensor' transgenes uncover Hox-like

- and other developmentally regulated patterns of vertebrate microRNA expression." *Nat Genet* 36(10): 1079-83.
- Mehler, M. F., P. C. Mabie, D. Zhang and J. A. Kessler (1997). "Bone morphogenetic proteins in the nervous system." *Trends Neurosci* 20(7): 309-17.
- Meier, F., M. Nesbit, M. Y. Hsu, B. Martin, P. Van Belle, D. E. Elder, G. Schaumburg-Lever, C. Garbe, T. M. Walz, P. Donatien, T. M. Crombleholme and M. Herlyn (2000). "Human melanoma progression in skin reconstructs : biological significance of bFGF." *Am J Pathol* 156(1): 193-200.
- Miller, A. J. and M. C. Mihm, Jr. (2006). "Melanoma." *N Engl J Med* 355(1): 51-65.
- Miyazaki, H., T. Watabe, T. Kitamura and K. Miyazono (2004). "BMP signals inhibit proliferation and in vivo tumor growth of androgen-insensitive prostate carcinoma cells." *Oncogene* 23(58): 9326-35.
- Miyazono, K. (1999). "Signal transduction by bone morphogenetic protein receptors: functional roles of Smad proteins." *Bone* 25(1): 91-3.
- Miyazono, K., Y. Kamiya and M. Morikawa (2010). "Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction." *J Biochem* 147(1): 35-51.
- Miyazono, K., S. Maeda and T. Imamura (2005). "BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk." *Cytokine Growth Factor Rev* 16(3): 251-63.
- Miyazono, K. and K. Miyazawa (2002). "Id: a target of BMP signaling." *Sci STKE* 2002(151): pe40.
- Montesano, R., R. Sarkozi and H. Schramek (2008). "Bone morphogenetic protein-4 strongly potentiates growth factor-induced proliferation of mammary epithelial cells." *Biochem Biophys Res Commun* 374(1): 164-8.
- Morinaga, Y., N. Fujita, K. Ohishi and T. Tsuruo (1997). "Stimulation of interleukin-11 production from osteoblast-like cells by transforming growth factor-beta and tumor cell factors." *Int J Cancer* 71(3): 422-8.
- Morrison, C. J., G. S. Butler, H. F. Bigg, C. R. Roberts, P. D. Soloway and C. M. Overall (2001). "Cellular activation of MMP-2 (gelatinase A) by MT2-MMP occurs via a TIMP-2-independent pathway." *J Biol Chem* 276(50): 47402-10.
- Mueller, D. W. and A. K. Bosserhoff (2010). "MicroRNA miR-196a controls melanoma-associated genes by regulating HOX-C8 expression." *Int J Cancer*.
- Mueller, D. W., M. Rehli and A. K. Bosserhoff (2009). "miRNA expression profiling in melanocytes and melanoma cell lines reveals miRNAs associated with formation and progression of malignant melanoma." *J Invest Dermatol* 129(7): 1740-51.
- Muller, D. W. and A. K. Bosserhoff (2008). "Integrin beta 3 expression is regulated by let-7a miRNA in malignant melanoma." *Oncogene* 27(52): 6698-706.
- Nagase, H. and J. F. Woessner, Jr. (1999). "Matrix metalloproteinases." *J Biol Chem* 274(31): 21491-4.
- Nakamura, Y., K. Tensho, H. Nakaya, M. Nawata, T. Okabe and S. Wakitani (2005). "Low dose fibroblast growth factor-2 (FGF-2) enhances bone morphogenetic protein-2 (BMP-2)-induced ectopic bone formation in mice." *Bone* 36(3): 399-407.
- Newberry, E. P., D. Willis, T. Latifi, J. M. Boudreaux and D. A. Towler (1997). "Fibroblast growth factor receptor signaling activates the human interstitial collagenase promoter via the bipartite Ets-AP1 element." *Mol Endocrinol* 11(8): 1129-44.

- Nohe, A., E. Keating, P. Knaus and N. O. Petersen (2004). "Signal transduction of bone morphogenetic protein receptors." *Cell Signal* 16(3): 291-9.
- Oikawa, T. (2004). "ETS transcription factors: possible targets for cancer therapy." *Cancer Sci* 95(8): 626-33.
- Panka, D. J., M. B. Atkins and J. W. Mier (2006). "Targeting the mitogen-activated protein kinase pathway in the treatment of malignant melanoma." *Clin Cancer Res* 12(7 Pt 2): 2371s-2375s.
- Park, S. H. (2005). "Fine tuning and cross-talking of TGF-beta signal by inhibitory Smads." *J Biochem Mol Biol* 38(1): 9-16.
- Peters, K. G., C. D. Kontos, P. C. Lin, A. L. Wong, P. Rao, L. Huang, M. W. Dewhirst and S. Sankar (2004). "Functional significance of Tie2 signaling in the adult vasculature." *Recent Prog Horm Res* 59: 51-71.
- Piccirillo, S. G. and A. L. Vescovi (2006). "Bone morphogenetic proteins regulate tumorigenicity in human glioblastoma stem cells." *Ernst Schering Found Symp Proc*(5): 59-81.
- Pollock, P. M., U. L. Harper, K. S. Hansen, L. M. Yudt, M. Stark, C. M. Robbins, T. Y. Moses, G. Hostetter, U. Wagner, J. Kakareka, G. Salem, T. Pohida, P. Heenan, P. Duray, O. Kallioniemi, N. K. Hayward, J. M. Trent and P. S. Meltzer (2003). "High frequency of BRAF mutations in nevi." *Nat Genet* 33(1): 19-20.
- Polsky, D. and C. Cordon-Cardo (2003). "Oncogenes in melanoma." *Oncogene* 22(20): 3087-91.
- Pountos, I., T. Georgouli, K. Henshaw, H. Bird, E. Jones and P. V. Giannoudis (2010). "The effect of bone morphogenetic protein-2, bone morphogenetic protein-7, parathyroid hormone, and platelet-derived growth factor on the proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells derived from osteoporotic bone." *J Orthop Trauma* 24(9): 552-6.
- Prieto, I., A. Kouznetsova, A. Futterer, V. Trachana, E. Leonardo, A. Alonso Guerrero, M. Cano Gamero, C. Pacios-Bras, H. Leh, M. Buckle, M. Garcia-Gallo, L. Kremer, A. Serrano, F. Roncal, J. P. Albar, J. L. Barbero, A. C. Martinez and K. H. van Wely (2009). "Synaptonemal complex assembly and H3K4Me3 demethylation determine DIDO3 localization in meiosis." *Chromosoma* 118(5): 617-32.
- Rider, C. C. and B. Mulloy (2010). "Bone morphogenetic protein and growth differentiation factor cytokine families and their protein antagonists." *Biochem J* 429(1): 1-12.
- Rodeck, U., A. Bossler, U. Graeven, F. E. Fox, P. C. Nowell, C. Knabbe and C. Kari (1994). "Transforming growth factor beta production and responsiveness in normal human melanocytes and melanoma cells." *Cancer Res* 54(2): 575-81.
- Rothhammer, T., F. Bataille, T. Spruss, G. Eissner and A. K. Bosserhoff (2007). "Functional implication of BMP4 expression on angiogenesis in malignant melanoma." *Oncogene* 26(28): 4158-70.
- Rothhammer, T., S. Braig and A. K. Bosserhoff (2008). "Bone morphogenetic proteins induce expression of metalloproteinases in melanoma cells and fibroblasts." *Eur J Cancer* 44(16): 2526-34.
- Rothhammer, T., J. C. Hahne, A. Florin, I. Poser, F. Soncin, N. Wernert and A. K. Bosserhoff (2004). "The Ets-1 transcription factor is involved in the development and invasion of malignant melanoma." *Cell Mol Life Sci* 61(1): 118-28.
- Rothhammer, T., I. Poser, F. Soncin, F. Bataille, M. Moser and A. K. Bosserhoff (2005). "Bone morphogenic proteins are overexpressed in malignant melanoma and promote cell invasion and migration." *Cancer Res* 65(2): 448-56.

- Rothhammer, T., P. J. Wild, S. Meyer, F. Bataille, A. Pauer, M. Klinkhammer-Schalke, R. Hein, F. Hofstaedter and A. K. Bosserhoff (2007). "Bone morphogenetic protein 7 (BMP7) expression is a potential novel prognostic marker for recurrence in patients with primary melanoma." *Cancer Biomark* 3(2): 111-7.
- Ruddle, F. H., J. L. Bartels, K. L. Bentley, C. Kappen, M. T. Murtha and J. W. Pendleton (1994). "Evolution of Hox genes." *Annu Rev Genet* 28: 423-42.
- Saito, H., K. Yasumoto, K. Takeda, K. Takahashi, A. Fukuzaki, S. Orikasa and S. Shibahara (2002). "Melanocyte-specific microphthalmia-associated transcription factor isoform activates its own gene promoter through physical interaction with lymphoid-enhancing factor 1." *J Biol Chem* 277(32): 28787-94.
- Samad, T. A., A. Rebbapragada, E. Bell, Y. Zhang, Y. Sidis, S. J. Jeong, J. A. Campagna, S. Perusini, D. A. Fabrizio, A. L. Schneyer, H. Y. Lin, A. H. Brivanlou, L. Attisano and C. J. Woolf (2005). "DRAGON, a bone morphogenetic protein co-receptor." *J Biol Chem* 280(14): 14122-9.
- Sanchez-Pulido, L., A. M. Rojas, K. H. van Wely, A. C. Martinez and A. Valencia (2004). "SPOC: a widely distributed domain associated with cancer, apoptosis and transcription." *BMC Bioinformatics* 5: 91.
- Sauter, E. R. and M. Herlyn (1998). "Molecular biology of human melanoma development and progression." *Mol Carcinog* 23(3): 132-43.
- Schorle, H., P. Meier, M. Buchert, R. Jaenisch and P. J. Mitchell (1996). "Transcription factor AP-2 essential for cranial closure and craniofacial development." *Nature* 381(6579): 235-8.
- Seftor, E. A., P. S. Meltzer, G. C. Schatteman, L. M. Gruman, A. R. Hess, D. A. Kirschmann, R. E. Seftor and M. J. Hendrix (2002). "Expression of multiple molecular phenotypes by aggressive melanoma tumor cells: role in vasculogenic mimicry." *Crit Rev Oncol Hematol* 44(1): 17-27.
- Segura, M. F., D. Hanniford, S. Menendez, L. Reavie, X. Zou, S. Alvarez-Diaz, J. Zakrzewski, E. Blochin, A. Rose, D. Bogunovic, D. Polsky, J. Wei, P. Lee, I. Belitskaya-Levy, N. Bhardwaj, I. Osman and E. Hernando (2009). "Aberrant miR-182 expression promotes melanoma metastasis by repressing FOXO3 and microphthalmia-associated transcription factor." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(6): 1814-9.
- Selzer, E., V. Wacheck, T. Lucas, E. Heere-Ress, M. Wu, K. N. Weilbaecher, W. Schlegel, P. Valent, F. Wrba, H. Pehamberger, D. Fisher and B. Jansen (2002). "The melanocyte-specific isoform of the microphthalmia transcription factor affects the phenotype of human melanoma." *Cancer Res* 62(7): 2098-103.
- Shah, N. and S. Sukumar (2010). "The Hox genes and their roles in oncogenesis." *Nat Rev Cancer* 10(5): 361-71.
- Sharrocks, A. D., A. L. Brown, Y. Ling and P. R. Yates (1997). "The ETS-domain transcription factor family." *Int J Biochem Cell Biol* 29(12): 1371-87.
- Shellman, Y. G., M. Makela and D. A. Norris (2006). "Induction of secreted matrix metalloproteinase-9 activity in human melanoma cells by extracellular matrix proteins and cytokines." *Melanoma Res* 16(3): 207-11.
- Shen, H. M. and V. Tergaonkar (2009). "NFkappaB signaling in carcinogenesis and as a potential molecular target for cancer therapy." *Apoptosis* 14(4): 348-63.
- Shih, I. M. and M. Herlyn (1993). "Role of growth factors and their receptors in the development and progression of melanoma." *J Invest Dermatol* 100(2 Suppl): 196S-203S.

- Shore, E. M. and F. S. Kaplan (2010). "Inherited human diseases of heterotopic bone formation." *Nat Rev Rheumatol* 6(9): 518-27.
- Sieber, C., J. Kopf, C. Hiepen and P. Knaus (2009). "Recent advances in BMP receptor signaling." *Cytokine Growth Factor Rev* 20(5-6): 343-55.
- Smalley, K. S. (2003). "A pivotal role for ERK in the oncogenic behaviour of malignant melanoma?" *Int J Cancer* 104(5): 527-32.
- Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson and D. C. Klenk (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid." *Anal Biochem* 150(1): 76-85.
- Smith, W. C. and R. M. Harland (1992). "Expression cloning of noggin, a new dorsalizing factor localized to the Spemann organizer in *Xenopus* embryos." *Cell* 70(5): 829-40.
- Srebrow, A., Y. Friedmann, A. Ravanpay, C. W. Daniel and M. J. Bissell (1998). "Expression of Hoxa-1 and Hoxb-7 is regulated by extracellular matrix-dependent signals in mammary epithelial cells." *J Cell Biochem* 69(4): 377-91.
- Stenvang, J., A. N. Silahatoglu, M. Lindow, J. Elmen and S. Kauppinen (2008). "The utility of LNA in microRNA-based cancer diagnostics and therapeutics." *Semin Cancer Biol* 18(2): 89-102.
- Suzuki, Y., K. Montagne, A. Nishihara, T. Watabe and K. Miyazono (2008). "BMPs promote proliferation and migration of endothelial cells via stimulation of VEGF-A/VEGFR2 and angiopoietin-1/Tie2 signalling." *J Biochem* 143(2): 199-206.
- Takahashi, O., J. Hamada, M. Abe, S. Hata, T. Asano, Y. Takahashi, M. Tada, M. Miyamoto, S. Kondo and T. Moriuchi (2007). "Dysregulated expression of HOX and ParaHOX genes in human esophageal squamous cell carcinoma." *Oncol Rep* 17(4): 753-60.
- Tergaonkar, V. (2006). "NFkappaB pathway: a good signaling paradigm and therapeutic target." *Int J Biochem Cell Biol* 38(10): 1647-53.
- Thawani, J. P., A. C. Wang, K. D. Than, C. Y. Lin, F. La Marca and P. Park (2010). "Bone morphogenetic proteins and cancer: review of the literature." *Neurosurgery* 66(2): 233-46; discussion 246.
- Theriault, B. L., T. G. Shepherd, M. L. Mujoomdar and M. W. Nachtigal (2007). "BMP4 induces EMT and Rho GTPase activation in human ovarian cancer cells." *Carcinogenesis* 28(6): 1153-62.
- Tsunoda, S., T. Nakamura, H. Sakurai and I. Saiki (2007). "Fibroblast growth factor-2-induced host stroma reaction during initial tumor growth promotes progression of mouse melanoma via vascular endothelial growth factor A-dependent neovascularization." *Cancer Sci* 98(4): 541-8.
- Turgeman, G., D. D. Pittman, R. Muller, B. G. Kurkalli, S. Zhou, G. Pelled, A. Peyser, Y. Zilberman, I. K. Moutsatsos and D. Gazit (2001). "Engineered human mesenchymal stem cells: a novel platform for skeletal cell mediated gene therapy." *J Gene Med* 3(3): 240-51.
- Urist, M. R. (1965). "Bone: formation by autoinduction." *Science* 150(698): 893-9.
- Valastyan, S., F. Reinhardt, N. Benaich, D. Calogrias, A. M. Szasz, Z. C. Wang, J. E. Brock, A. L. Richardson and R. A. Weinberg (2009). "A pleiotropically acting microRNA, miR-31, inhibits breast cancer metastasis." *Cell* 137(6): 1032-46.
- Vasudevan, S., Y. Tong and J. A. Steitz (2007). "Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation." *Science* 318(5858): 1931-4.

- Ventura, A. and T. Jacks (2009). "MicroRNAs and cancer: short RNAs go a long way." *Cell* 136(4): 586-91.
- Walsh, D. W., C. Godson, D. P. Brazil and F. Martin (2010). "Extracellular BMP-antagonist regulation in development and disease: tied up in knots." *Trends Cell Biol* 20(5): 244-56.
- Wang, Y. and D. Becker (1997). "Antisense targeting of basic fibroblast growth factor and fibroblast growth factor receptor-1 in human melanomas blocks intratumoral angiogenesis and tumor growth." *Nat Med* 3(8): 887-93.
- Westermarck, J. and V. M. Kahari (1999). "Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion." *Faseb J* 13(8): 781-92.
- Widlund, H. R. and D. E. Fisher (2003). "Microphthalmia-associated transcription factor: a critical regulator of pigment cell development and survival." *Oncogene* 22(20): 3035-41.
- Wozney, J. M. (1992). "The bone morphogenetic protein family and osteogenesis." *Mol Reprod Dev* 32(2): 160-7.
- Wu, J. B., H. Q. Fu, L. Z. Huang, A. W. Liu and J. X. Zhang (2010). "Effects of siRNA-targeting BMP-2 on the abilities of migration and invasion of human liver cancer SMMC7721 cells and its mechanism." *Cancer Gene Ther*.
- Wu, X., H. Chen, B. Parker, E. Rubin, T. Zhu, J. S. Lee, P. Argani and S. Sukumar (2006). "HOXB7, a homeodomain protein, is overexpressed in breast cancer and confers epithelial-mesenchymal transition." *Cancer Res* 66(19): 9527-34.
- Xiao, Y. T., L. X. Xiang and J. Z. Shao (2007). "Bone morphogenetic protein." *Biochem Biophys Res Commun* 362(3): 550-3.
- Yamamoto, Y. and M. Oelgeschlager (2004). "Regulation of bone morphogenetic proteins in early embryonic development." *Naturwissenschaften* 91(11): 519-34.
- Yasumoto, K., K. Takeda, H. Saito, K. Watanabe, K. Takahashi and S. Shibahara (2002). "Microphthalmia-associated transcription factor interacts with LEF-1, a mediator of Wnt signaling." *Embo J* 21(11): 2703-14.
- Ye, L., J. M. Lewis-Russell, H. Kynaston and W. G. Jiang (2007). "Endogenous bone morphogenetic protein-7 controls the motility of prostate cancer cells through regulation of bone morphogenetic protein antagonists." *J Urol* 178(3 Pt 1): 1086-91.
- Yekta, S., I. H. Shih and D. P. Bartel (2004). "MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA." *Science* 304(5670): 594-6.
- Yi, S. E., A. Daluiski, R. Pederson, V. Rosen and K. M. Lyons (2000). "The type I BMP receptor BMPRII is required for chondrogenesis in the mouse limb." *Development* 127(3): 621-30.
- Yu, P. B., C. C. Hong, C. Sachidanandan, J. L. Babbitt, D. Y. Deng, S. A. Hoyng, H. Y. Lin, K. D. Bloch and R. T. Peterson (2008). "Dorsomorphin inhibits BMP signals required for embryogenesis and iron metabolism." *Nat Chem Biol* 4(1): 33-41.
- Zeng, Y. X., K. Somasundaram and W. S. el-Deiry (1997). "AP2 inhibits cancer cell growth and activates p21WAF1/CIP1 expression." *Nat Genet* 15(1): 78-82.

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
as	antisense
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	copy DNA
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
Dido1	Death inducer obliterator1
DMEM	Dulbeccos modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid; Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyriboonukleosidtriphosphat
ds	Doppelstrang
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-N',N',N',N',Tetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)- N',N',N',N',Tetraacetat
ERK	Extracellular Signaling-Regulated Kinase
et al.	et alii (lat.: „und andere“)
FGF	Fibroblast Growth Factor
FKS	Fötales Kälberserum
g	Gramm; Gravitationskraft
h	Stunden
IGF	Insulin-like Growth Factor

k	Kilo (10^3)
kb	Kilobasen(paare)
kDa	Kilo-Dalton
l	Liter
LB	Luria Bertani
m	Milli (10^{-3})
M	Mol; molar
mA	Milliampere
min	Minute(n)
mRNA	messenger-RNA
μ	Mikro (10^{-6})
n	Nano (10^{-9})
NHEM	Normale humane epidermale Melanozyten
nm	Nanometer
ns	nicht signifikant
OD	Optische Dichte
p	Pico (10^{-12})
PAA	Poly-Acrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RIPA	radio-immunoprecipitation assay
RNA	ribonucleic acid; Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	reverse transcriptase polymerase chain reaction

SDS	Sodiumdodecylsulfat; Natriumdodecylsulfat
sec bzw. s	Sekunde(n)
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Borat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TGF	Transforming Growth Factor
U	Unit; Uracil
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
(v/v)	Volumenprozent (volume per volume)
(w/v)	Gewicht pro Volumen (weight per volume)
°C	Grad Celsius

Danksagung

Als erstes möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Prof. Dr. Anja-Katrin Bosserhoff für ihre engagierte Betreuung, ihren unermüdlichen Einsatz, die ständige Diskussionsbereitschaft und Unterstützung bedanken.

Mein besonderer Dank gilt auch Prof. Dr. Ernst Tamm, der meine Arbeit an der biologischen Fakultät vertreten hat.

Vielen Dank an Prof. Dr. Ferdinand Hofstädter für die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Regensburg durchführen zu können.

Ein ganz großes Dankeschön geht an die gesamte AG Bosserhoff für die tolle Zeit im Labor. Ganz besonders möchte ich Daniel danken, der mir bei sämtlichen Krisen stets mit Rat und Tat zur Seite stand und durch seine fachliche Kompetenz wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beitrug. Vielen herzlichen Dank auch an Lisa, die mir immer erlaubte ihre Eisbox mitzubedenken und den Laboralltag so kurzweilig gestaltete. Ein großes Dankeschön auch dafür, dass du mich so manches Mal mit dem Auto (nicht nur) ins Labor mitnimmst! Bei Uli möchte ich mich ganz herzlich für die großartige Zusammenarbeit und das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken. Vielen Dank für deine Geduld und die hilfreichen Anregungen! Simone und Sibylla danke ich besonders für die netten Kaffeepausen und die unterhaltsamen Gespräche. Ein ganz herzliches Dankeschön geht auch an Susanne und Johanna für die vielen aufheiternden Worte. Dir, Jacqueline, vielen Dank für die nötigen Ablenkungen während des Verfassens dieser Arbeit! Alex und Florian danke ich ganz herzlich für die Unterstützung bei meinen zahlreichen Auseinandersetzungen mit dem Laptop.

Ein riesiges Dankeschön geht natürlich auch an meine Eltern, die mir mein Studium und die Promotion erst ermöglicht haben. Vielen Dank, dass ihr immer für mich da seid und mich stets unterstützt habt!

Bei Stefan möchte ich mich ganz besonders für die unendliche Geduld und die Bereitschaft bei Wind und Wetter immer wieder bis nach Regensburg zu fahren bedanken.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, *Simone Braig*, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig und nur unter der Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Des Weiteren versichere ich, dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat sowie dass ich mich noch nicht anderweitig um einen Doktorgrad beworben habe bzw. einen solchen bereits besitze.

.....
(Ort, Datum)

.....
(Unterschrift)